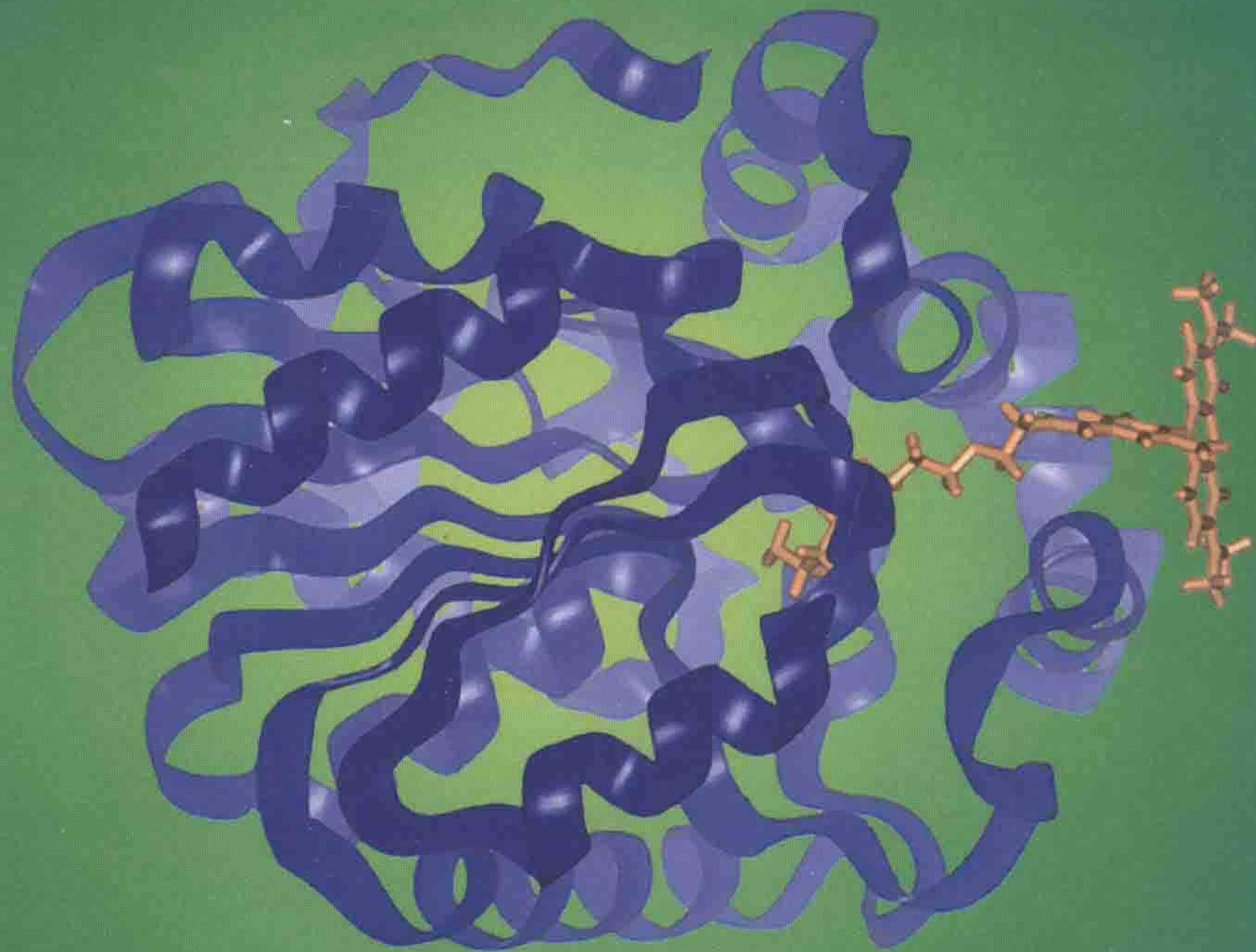

生命科学实验指南系列



免疫学技术及其应用

曹雪涛　主　编
于益芝　孙卫民　徐红梅　副主编




科　学　出　版　社

生命科学实验指南系列·典藏版



图解微生物实验指南
免疫学技术及其应用
生物衰老：研究方法与实验方案
精编细胞生物学实验指南
植物蛋白质组学实验指南
蛋白质纯化指南（原书第二版）
环境基因组学实验指南
实验动物血液生理生化参考手册
生理学实验指南
精编免疫学实验指南
酵母遗传学方法实验指南
人干细胞培养
抗体制备及使用实验指南
病毒的电子显微学研究
植物生物学与生态学实验
神经生物学实验原理与技术
DNA微阵列实验指南
基因转移：DNA和RNA的转运与表达
生物实验室管理手册（原书第二版）
精编人类遗传学实验指南
单分子技术实验指南
现代蛋白质工程实验指南
活细胞成像（原书第二版）
遗传变异分析实验指南
表皮细胞实验指南
分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册）
精编分子生物学实验指南（原书第五版）
现代神经科学研究技术
生命科学实验设计指南
现代生物化学与分子生物学仪器与设备
分子细胞遗传学——技术和应用
精编蛋白质科学实验指南
实验细胞资源的描述标准与管理规范
实验动物设施运行管理指南
元基因组学：方法和步骤（影印版）
现代工业微生物学实验技术
真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版）
动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn

销售分类建议：分子生物技术



赛拉艾芙
生命科学订阅号



本书彩插及
更多信息请扫码



ISBN 978-7-03-047486-5

定价（全套）：4500.00元

“十一五”国家重点图书出版规划项目
生命科学实验指南系列·典藏版

免疫学技术及其应用

曹雪涛　主　编
于益芝　孙卫民　徐红梅　副主编

科学出版社
北　京

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

《免疫学技术及其应用》编委会名单

主　编　曹雪涛

副主编　于益芝　孙卫民　徐红梅

编　委　（按姓氏笔画排序）

于益芝　万　涛　王全兴　王青青　王春梅
王晓健　占贞贞　田野苹　刘书逊　刘星光
刘秋燕　安华章　许雄飞　孙卫民　杨明金
苏小平　李　楠　吴艳峰　陈朱波　陈国友
陈涛涌　张　婷　张　意　张明刚　郑月娟
郑媛媛　侯　晋　夏大静　钱　莉　钱　程
徐　胜　徐红梅　郭振红　曹雪涛　韩岩梅
韩超峰　韩德平　蒋应明

前　言

免疫学是生物医学领域重要的基础学科和前沿学科，与人类健康与重大疾病防治密切相关。免疫学理论的发展和突破离不开免疫学实验的支撑和免疫学技术的革新。随着生命科学和生物高技术的发展与交叉融合，高端仪器设备和技术手段不断应用于免疫学领域，免疫学技术得到了非常迅速的发展，新技术不断涌现，在众多免疫学研究领域取得了很好的应用效果，极大地促进了免疫学的整体发展，也推动了免疫学理论、技术在临床疾病诊断、治疗与预防中的应用。回顾生物医学发展史，许多重大突破性进展与技术创新密切相关，每一次实验技术体系的突破往往推动了生物医学重要学术观点、理论体系，甚至科学思想的进步与发展。纵观国内生物医学的发展，尚缺乏真正意义上的具有革命性的技术创新，也鲜有得到国际学术界公认的独创性理论体系。在国内外这种大背景下，系统、全面地介绍免疫学实验技术的原理、方法和应用，从一个侧面推动国内免疫学的整体发展，显得十分迫切和必要。本书正是在这样的背景下酝酿而成，旨在阐释免疫学技术理论背景和基本原理的基础上，以典型实验技术为例，比较详细地介绍常用的免疫学实验操作流程和方法。使读者在理解实验原理的基础上，可以比较不同技术方法的优势和局限性，结合自身实验条件，灵活有效地加以选择应用，为科研提供技术方法的支撑，解决实际问题。

本书包括以下七部分内容：

免疫细胞相关实验技术　介绍单核巨噬细胞、树突状细胞、NK细胞、T细胞、B细胞，以及这些细胞亚群（如pDC、DCreg、Th1、Th2、Th17、Treg、B细胞亚群等）的理论背景、相关实验技术原理和具体方法。

免疫分子相关实验技术　介绍抗原（包括抗原肽）、抗体（包括单抗、多抗、基因工程抗体）、补体、细胞因子及其受体、HLA、TLR等的背景知识、相关研究技术的原理和实验方法。

免疫学相关标记技术　介绍免疫学相关标记技术，包括荧光、酶、放射、磁珠标记技术和发光免疫分析技术原理、具体方法和应用。

免疫学相关分子生物学技术　主要介绍基因克隆和表达技术、PCR（特别是定量PCR技术）、RNA干扰、microRNA技术等的原理、选择策略与依据、关键注意事项和应用实例。

免疫学相关蛋白质技术　介绍了经典的蛋白质电泳、印迹技术，如SDS-PAGE、双向电泳、Western印迹和斑点印迹。此外，在蛋白质间相互作用章节介绍了酵母双杂交系统、免疫共沉淀技术、GST pull-down和最近发展出的BIAcore技术等。

免疫学相关检测技术　介绍了经典的抗原抗体血清学反应、流式细胞分析和分选技术、细胞凋亡和细胞周期检测技术、免疫组织化学技术、免疫细胞信号转导研究技术、激光扫描共聚焦显微镜技术等相关的技术原理以及在免疫学研究中的应用。

免疫学实验相关动物模型　介绍了自身免疫病动物模型（如自身免疫性脑脊髓炎、自身免疫性甲状腺炎、系统性红斑狼疮等）、感染性疾病动物模型（如利什曼原虫、弓形虫、巨细胞病毒、李斯特菌等）、肿瘤动物模型、器官移植动物模型等免疫学研究常用的动物模型的相关原理、应用范围和制备方法。此外，还介绍了转基因动物和基因敲除动物的研究原理、应用和相关技术流程。

本书将前沿性、理论性和实用性紧密结合。在介绍免疫学基本技术、经典实验的同时，更注重免疫学技术的最新发展及其在科研工作中的实际应用，在介绍具体实验技术时，强调技术的原理及有效应用，突出实验操作中的关键注意事项和影响因素，力求减少研究者在实验方法选择上的失误和操作中的差错。本书编者大多是有着丰富的免疫学教学经验，且长期从事一线科研工作的中青年学者，书中的技术方法参考了该领域的国际标准，并结合了各编者的科研实践，体现了国际标准化和应用性相结合。有些方法是各编者多年科研实践的心得和体会，很多示意图是作者根据自己的实验结果精心制作而成，着力体现本书方法的指导性和原创性。

本书是免疫学及相关专业研究人员进行科研的重要辅助工具，对广大医学和生命科学工作者也有很大的参考价值，亦可选择部分内容作为本科生和研究生教材使用。在全书的编写过程中，各编者通力合作、竭尽所能，力求科学、准确，但囿于学术水平、实验技术，以及实践经验等的限制，虽反复斟酌但仍难以尽善尽美，书中的缺点和疏漏在所难免，敬请各位专家和广大读者批评和指正。

2010 年 5 月于第二军医大学

目　　录

第一章　单核吞噬细胞

第一节　单核吞噬细胞简介

单核吞噬细胞系统（mononuclear phagocytic system，MPS）包括血液中的单核细胞和组织中的巨噬细胞（macrophage，Mφ）。单核细胞来源于骨髓的多能干细胞，后者在骨髓微环境中发育为前单核细胞及单核细胞，单核细胞从骨髓释放入血，穿越血管内皮细胞，进入组织后分化为巨噬细胞。巨噬细胞包括结缔组织、淋巴结和脾脏中的巨噬细胞，肝脏的库普弗细胞，肺脏的肺泡巨噬细胞，神经组织的小胶质细胞，骨髓的破骨细胞等。

单核吞噬细胞是天然免疫系统的重要组成部分，可非特异性吞噬异物、细菌、衰老和突变的细胞等，参与维持机体内环境的稳定、天然抗感染、抗肿瘤免疫。此外，巨噬细胞在特异性免疫应答的诱导与效应中也具有十分重要的调控作用：在免疫应答的起始阶段，巨噬细胞作为抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC）摄取和处理抗原，以抗原肽-MHC-Ⅱ分子复合物的形式将抗原提呈给 Th 细胞，启动特异性免疫应答；在免疫应答的效应阶段，活化后的巨噬细胞趋化到病灶周围，更有效地吞噬细菌、杀伤靶细胞。活化后的巨噬细胞还分泌多种活性物质，如溶菌酶、补体、凝血因子、细胞因子等，发挥相应的生物学功能。单核吞噬细胞系统功能失调可引起多种疾病。

巨噬细胞具有异质性，包括不同分化阶段和不同活化状态的细胞，各具相应的形态、表型、代谢特征和生物学功能。静息状态的巨噬细胞体积小，杀伤活性低。活化后的巨噬细胞（activated macrophage）体积增大、溶酶体增多、代谢旺盛、产生呼吸暴发，消耗氧的同时释放大量活性氧中间体（reactive oxygen intermediate，ROI）和活性氮中间体（reactive nitrogen intermediate，RNI），抗感染及抗肿瘤效应显著增强。病原体、炎症刺激和细胞因子（如 IFN-γ）等均可诱导巨噬细胞活化，病原体感染时，巨噬细胞通过模式识别受体（pattern recognition receptor，PRR）识别病原微生物保守的病原体相关模式分子（pathogen-associated molecular pattern，PAMP），进而活化，活化后的巨噬细胞表面 MHC-Ⅱ类分子和共刺激分子的表达上调，释放多种细胞因子（如 IL-1、TNF、IL-12 和 IL-23）和趋化因子（如 MIP、MCP-1 等），参与免疫应答的起始和调控，主要诱导 Th1 型免疫应答，并参与 Th17 细胞的分化。

以上为经典活化的巨噬细胞（classically activated M1 macrophage），又称 M1 型巨噬细胞，通过分泌 IL-8、IP-10、MIP-1、RANTES 趋化中性粒细胞、DC、NK、T 细胞；分泌 IL-1、IL-6、TNF-α 等参与炎症反应；上调 NOS 合成 NO 有效杀灭病原体；合成多种基质蛋白酶 MMP-1、MMP-2、MMP-7、MMP-9、MMP-12 降解胶原等细胞

外基质。诱导 M1 型巨噬细胞活化的典型激活物为 PAMP（如 LPS）联合 IFN-γ，后者在免疫应答早期来自天然免疫的 NK 和 NKT 细胞，免疫应答后期则主要来自于活化的抗原特异性 Th 细胞。事实上不同类型的细胞因子及其组合等可诱导巨噬细胞分化为具有不同活性和功能特征的活化型巨噬细胞，如 IL-4、IL-13、IL-10、免疫复合物、糖皮质激素等活化的巨噬细胞，上调甘露糖受体、清道夫受体、FcγRⅡ和某些趋化因子（MDC/CCL22、PARC/CCL18、TARC/CCL17、AMAC-1 等）的表达，释放抑炎因子 IL-1Ra/IL-1F3、Ym1、Ym2、RELMa、IL-10 和 TGF-β 等，通过合成细胞外基质（Fibronectin、bIG-H3 等）、上调精氨酸酶合成多胺（而非 NO）、纤维细胞增殖、血管生成等参与伤口愈合、组织修复等，与 M1 型巨噬细胞相比，抗原提呈能力弱，称替代活化的 M2 型巨噬细胞（alternatively activated M2 macrophage），即 M2 型巨噬细胞。最近又有一种称为Ⅱ型活化的巨噬细胞（type Ⅱ activated macrophage），为第 3 种巨噬细胞的活化类型，主要分泌 IL-10、TGF-β，诱导 Th2 型免疫应答，表现为抑制炎症反应和 Th1 细胞介导的免疫应答。与 M1 型巨噬细胞类似，Ⅱ型巨噬细胞活化也需双信号共同诱导：第一信号为 FcγR 交联信号，第二信号由 TLR 或 CD40 提供。与 M2 型巨噬细胞不同，Ⅱ型活化的巨噬细胞不产生精氨酸酶和多胺；与 M1 型巨噬细胞不同，Ⅱ型活化的巨噬细胞分泌高水平的 IL-10 而非 IL-12，但其他细胞因子分泌谱与 M1 型巨噬细胞类似（TNF、IL-1 和 IL-6）。本章主要介绍经典活化的巨噬细胞及其检测方法，有关 M2 型巨噬细胞和Ⅱ型活化的巨噬细胞及其研究方法请参阅相关文献。

巨噬细胞具有很强的吞噬功能，其吞噬作用由细胞表面不同的受体介导，如凝集素样受体识别微生物表面的糖基；玻连蛋白受体识别凋亡相关分子；补体受体通过 C3bi 或 C3d 与抗原-抗体复合物结合；FcR 通过抗体 Fc 段与表达相应抗原的靶细胞（如肿瘤细胞和病原体）结合，增强巨噬细胞对靶细胞的吞噬能力，即 ADCC 作用。细胞因子等可通过调节巨噬细胞表面受体的表达影响巨噬细胞的吞噬和杀伤功能。单核巨噬细胞的分离和纯化是研究单核巨噬细胞功能和特性的起始环节，因此本章介绍了几种单核巨噬细胞的分离和纯化的方法；巨噬细胞的表型分析和检测主要借助流式细胞仪，通过特异性荧光抗体直接法或间接法标记相应表面抗原分子；本章最后还介绍了巨噬细胞的活化及其相关功能，如吞噬、杀伤等的检测。

第二节　单核巨噬细胞的分离

人单核巨噬细胞主要来源于外周血，鼠或其他物种单核巨噬细胞可由动物腹腔、淋巴结和肺泡等分离。通常样品先制备成单细胞悬液，经淋巴细胞分离液（Ficoll-Hypaque）密度梯度离心，分离出单个核细胞，再利用单核巨噬细胞强的黏附能力，贴壁法纯化巨噬细胞，或者利用单核巨噬细胞特征性的表面抗原，采用特异性抗体，磁珠法或流式细胞仪分选高纯度的单核巨噬细胞。

需要注意的是，体外长期培养可能影响单核巨噬细胞的表面特性或功能活性，所以实验时应尽可能采用新鲜分离的单核巨噬细胞。单核巨噬细胞黏附能力强，可黏附到玻璃或塑料表面。为减少操作过程中的细胞损耗，有效收获巨噬细胞，实验时应使用聚丙

烯材料的器材，且分离巨噬细胞的实验操作尽量在4℃条件下进行。

一、人外周血单个核细胞的分离

单个核细胞包括淋巴细胞和单核细胞等，根据人外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）的密度（1.075～1.090g/ml）与其他细胞（红细胞和多核白细胞的密度为1.090g/ml，血小板为1.030～1.035g/ml）间的差异，采用密度介于1.075～1.092g/ml的等渗溶液（分离液）进行密度梯度离心，使不同密度的细胞按各自的密度分布，从而将单个核细胞分离出来。最常用的单个核细胞分离液是Ficoll分离液，其主要成分是一种合成的蔗糖聚合物，称聚蔗糖（商品名为Ficoll），高浓度的Ficoll溶液黏性较高，常添加泛影葡胺（商品名Hypaque）以配制成密度及黏度合适的细胞分离液，称为Ficoll-Hypaque分离液。

不同物种单个核细胞的密度不同，分离时需采用相应密度的细胞分离液（表1-1），分离人外周血单个核细胞常用密度为（1.077±0.001）g/ml的分离液；大鼠、小鼠和马分别选用密度为1.083g/ml、1.092g/ml和1.091g/ml的分离液。以下以人外周血单个核细胞的分离为例介绍具体的操作过程。

表1-1　不同物种淋巴细胞分离液的密度

物种	密度/(g/ml)	物种	密度/(g/ml)
人	1.0770±0.0001	狗	1.0790±0.0001
大鼠	1.0830±0.0001	牛	1.0860±0.0001
小鼠	1.0920±0.0001	豚鼠	1.0850±0.0001
兔	1.0965±0.0001	马	1.0910±0.0001

材料与试剂

肝素抗凝液：无菌生理盐水配制，125～250U/ml，4℃保存

淋巴细胞分离液［Ficoll-Hypaque，密度（1.077±0.001)g/ml］

PBS，pH7.2～7.4

RPMI-10：含有10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基

15ml聚丙烯锥底离心管

台盼蓝染液

步骤

1）无菌采集血液，肝素抗凝（每毫升血液加入0.1ml肝素液）。

2）用等体积PBS稀释全血。

3）取等体积Ficoll-Hypaque分离液小心地加入15ml锥底离心管管底。

4）将离心管倾斜45°角，用吸管吸取稀释后的血液样品，在Ficoll-Hypaque分离液液面上1cm处，沿离心管壁缓慢地将血液样品叠加到分离液上，勿破坏分离液层界面。

5）室温400g水平离心20min。缓慢减速。

6）平稳取出离心管，此时最下层是红细胞和粒细胞，中间层是淋巴细胞分离液，最上层是血浆、稀释液等。血浆层与分离液交界处为一混浊的灰白色层（白膜层），富含单个核细胞。

7）用吸管轻轻吸取白膜层细胞，放入另一已预先盛有 RPMI-10 的试管中。

8）加入适量 PBS，室温下 200g 离心 10min，弃上清液（以下简称上清）。重复洗涤 1 或 2 次，尽量除去血小板。

9）台盼蓝拒染法检测细胞活力，调整单个核细胞至合适浓度。

注意事项

1）为保持单个核细胞的活性，采血后应尽快分离细胞（<8h）。一般每毫升健康成人血可获得 1×10^6～2×10^6 个单个核细胞，活细胞在 95%以上。

2）若血量大，可先室温下 400g 离心 20min，取血浆及红细胞交界面的白细胞，PBS 稀释后分离单个核细胞。

3）等体积稀释全血可降低红细胞的凝聚，提高单个核细胞的收获量和纯度，必要时可用 PBS 将全血 2～4 倍稀释。

4）未抗凝的血液可先用链激酶溶解血凝块，然后分离单个核细胞。

5）若样品为脐带血或婴儿血，为了提高单个核细胞的纯度，可重复 Ficoll-Hypaque 离心，降低红细胞及其前体细胞的污染。

6）吸取白膜层细胞时，也可先将上层血浆以及稀释液吸弃后，用吸管吸取。

7）本操作也适用于分离组织中的单个核细胞，制备脾脏、胸腺、淋巴结单细胞悬液的方法参见本书附录。

8）对于存放 2h 以上的血液，步骤 5）的离心时间可适当延长至 30min 左右。

二、小鼠腹腔巨噬细胞的分离和纯化

可用多种方法分离不同组织器官来源的小鼠巨噬细胞，其中以小鼠腹腔巨噬细胞取材最为方便，应用广泛。未经刺激的小鼠腹腔中可得到 2×10^6～3×10^6 个的腹腔细胞，其中静止状态的巨噬细胞占 50%～70%。如果先将一些刺激物（巯基乙酸或淀粉）注入小鼠腹腔，几天后收集腹腔细胞，可以得到大量炎性巨噬细胞（每只小鼠为 1×10^7～2×10^7 个）。小鼠腹腔细胞除含有巨噬细胞外，还含有少量淋巴细胞和粒细胞，根据实验需要可进一步纯化，常用贴壁法和 Percoll 离心法纯化巨噬细胞，但所分离的巨噬细胞纯度较低，对于要求严格的实验，可用磁珠法或流式细胞仪分选高纯度的单核巨噬细胞。

材料与试剂

小鼠（6 周龄左右）

无菌巯基乙酸肉汤或 4%淀粉肉汤

75%乙醇

无菌剪刀，镊子，小鼠固定板

DMEM-20：含有 20%胎牛血清的 DMEM 完全培养基

DMEM-10：含有10%胎牛血清的DMEM完全培养基

DMEM-0：无血清的DMEM培养基，冰预冷

Percoll细胞分离液（密度1.113g/ml）

15ml聚丙烯锥底离心管

台盼蓝染液

步骤

1. 小鼠腹腔巨噬细胞的分离

1）消毒小鼠腹部，腹腔注射2ml无菌巯基乙酸肉汤或4%淀粉肉汤。3～4d以后处死小鼠，收集炎性腹腔巨噬细胞。

2）如收集静息状态的腹腔巨噬细胞，不注射肉汤，直接从此步骤开始。放血处死小鼠（可减少腹腔中的红细胞），将小鼠浸入75%乙醇中消毒3～5min。

3）小鼠腹部向上固定，剪开腹部皮肤，双手持镊撕开皮肤，拉向两侧，暴露腹膜，注意勿伤及腹膜壁。

4）用注射器沿腹中线注入10ml冰预冷的DMEM-0，同时从两侧轻轻揉压小鼠腹膜5min，注意此时针头最好不拔出。

5）用针头轻轻挑起腹壁，小鼠微倾向一侧，使腹腔中液体集于针头下，将腹腔灌洗液吸取入针管内。

6）小心拔出针头，把腹腔灌洗液注入干净的离心管中。重复冲洗腹腔2或3次，合并所收集的腹腔灌洗液。

7）将收集的腹腔灌洗液于4℃下250g离心10min，去上清。用预冷的DMEM-0洗涤细胞2或3次，弃上清。

8）用预冷的RPMI-10悬浮腹腔巨噬细胞，台盼蓝拒染法检测细胞活力，调整细胞至合适浓度备用。

2. 贴壁法纯化巨噬细胞

贴壁法纯化巨噬细胞的原理是根据单核巨噬细胞具有黏附塑料或玻璃表面的特性，而淋巴细胞无此特性，可借此将单核巨噬细胞和淋巴细胞分开。此法所分离的单核巨噬细胞纯度较低，但方法简单，常用于巨噬细胞的初步纯化。需注意的是贴壁法纯化巨噬细胞快捷简单，但可能诱导巨噬细胞活化。

1）用DMEM-20调节巨噬细胞浓度。以每平方厘米2×10^5～4×10^5个巨噬细胞的密度将巨噬细胞接种到玻璃或塑料培养皿（瓶）中。37℃、5%CO_2细胞培养箱中培养1～2h或过夜。

2）摇晃培养皿（瓶），然后充分吸弃未贴壁细胞。加入DMEM-0洗涤细胞3或4次。

3）加入适量含EDTA的胰酶消化液，37℃消化贴壁细胞15～30min，吸弃消化液，加入适量DMEM-10。

4）用吸管吹打收集贴壁的巨噬细胞，加入离心管中。250g离心10min，去上清。

5）用DMEM-10重悬巨噬细胞，台盼蓝拒染法检测细胞活力，调整巨噬细胞至所

需浓度备用。

3. Percoll 离心法纯化巨噬细胞

Percoll 是一种经聚乙烯吡咯烷酮处理的硅胶颗粒，经高速离心后形成一个从管底到液面密度逐渐递减的连续密度梯度，将单个核细胞悬液轻轻叠加在液面上，低速离心后，便得到 4 个细胞层。表层为死细胞残片和血小板，底层为粒细胞和红细胞，中间有两层，上层富含巨噬细胞，下层富含淋巴细胞。

1）在 15ml 离心管中加入 3ml FCS，并轻轻地将 PBMC 加在上面，200*g* 离心 10min，弃含血小板的上清。用 DMEM-10 重悬细胞沉淀，调整浓度为 2×10^7～5×10^7 个/ml。

2）在 15ml 离心管中加入 7ml Percoll 和 6ml 2×PBS。21 000*g* 室温水平离心 40min，形成连续的 Percoll 梯度。

3）轻轻地将无血小板的单核细胞加到形成的梯度上，4℃下 1000*g* 离心 20min。

4）用吸管仔细吸去顶层不透明带的细胞（死细胞、碎片和少量血小板）。用新的离心管收集第二层细胞，其中含 70%～90% 巨噬细胞。

5）洗涤并计数纯化的巨噬细胞，调整细胞至合适浓度备用。

注意事项

1）雄性小鼠肠壁脂肪多，不利于腹腔灌洗液收集，6～8 周雌性小鼠较好。

2）在收集腹腔灌洗液时，操作应小心，避免刺破血管或肠壁。

3）此法可用于分离豚鼠或家兔腹腔巨噬细胞，此时选用 600g 左右的豚鼠或 3kg 左右的家兔。腹腔注射巯基乙酸肉汤或淀粉肉汤时，豚鼠用量为 20ml、家兔为 50ml。收集腹腔灌洗液细胞时，向豚鼠腹腔注入 20～40ml、家兔腹腔注入 50～70ml 冰预冷的 DMEM-0。

4）增加洗涤次数可提高巨噬细胞的纯度。

5）小鼠腹腔巨噬细胞与培养皿黏附牢固，可用专用橡皮细胞刮子收集贴壁细胞。

6）1h 贴壁法耗时短，但会损失部分黏附力弱的巨噬细胞。过夜培养可提高巨噬细胞得率，并且 20%～40%的小牛血清可以减少淋巴细胞的黏附。

三、小鼠肺内巨噬细胞的分离

大鼠、家兔肺内巨噬细胞的分离方法较多，这里介绍一种小鼠肺灌洗液中提取肺泡巨噬细胞的方法，经淋巴细胞分离液密度梯度离心后，巨噬细胞纯度可达 90%以上。

材料与试剂

小鼠（6 周龄左右）

75%乙醇

无菌剪刀，镊子，小鼠固定板

ACK 裂解液：0.17mol/L Tris，0.16mol/L NH_4Cl，将 10ml 0.17mol/L Tris 加到 90ml 0.16mol/L NH_4Cl 中，调节 pH 至 7.2

淋巴细胞分离液（密度 1.077g/ml）

15ml 聚丙烯锥底离心管

台盼蓝染液

步骤

1）颈椎脱臼法处死小鼠，用 75%乙醇浸泡消毒 3～5min。

2）剪开颈部皮肤，分离气管，用丝线在环状软骨下结扎。用 7 号头皮针向心方向穿入气管内，并用丝线固定。

3）取 2ml 注射器抽取 DMEM-0 培养液 1～2ml，缓慢推入气管，停留 1min 后再缓慢回抽，将回收的液体注入干净的离心管。

4）重复操作步骤 3）约 10 次，充分收集肺泡灌洗液。

5）4℃下 250*g* 离心 10min，去上清。轻弹试管底部，混匀细胞，加入 10ml ACK 裂解液作用 3～5min，裂解红细胞。

6）4℃下 250*g* 离心 10min，去上清。用 DMEM-0 重悬细胞沉淀，将细胞悬液加在淋巴细胞分离液上，室温下 400*g* 水平离心 20min，收集白膜层细胞。

7）用 DMEM-0 洗涤巨噬细胞 2 次。台盼蓝拒染法检测细胞活力，用 DMEM-10 调整巨噬细胞至合适浓度备用。

注意事项

1）将培养基推入小鼠气管时，动作应轻柔，速度缓慢，推完 1～2ml 培养基约需 1min。将培养基推入气管之前最好先回抽肺内残留气体。

2）分离的肺泡巨噬细胞也可以不经 ACK 裂解液处理，而直接用淋巴细胞分离液纯化。

四、骨髓巨噬细胞的分离和诱导培养

所有血细胞都来源于骨髓，骨髓中的造血干细胞在多种细胞因子和集落刺激因子的作用下，分化为髓样干细胞和淋巴样干细胞。髓样干细胞进一步分化为包括单核巨噬细胞在内的多种成熟血细胞。在髓样干细胞向单核巨噬细胞分化的过程中，起关键作用的细胞因子为 GM-CSF、M-CSF、IL-3 等，因此可在体外通过这些细胞因子诱导单核巨噬细胞的前体细胞定向分化为巨噬细胞，用于实验研究。

材料与试剂

小鼠（6 周左右）

75%乙醇

无菌剪刀，镊子，1ml 注射器

200 目钢网

ACK 裂解液

淋巴细胞分离液

1.0mg/ml 中性蛋白酶溶液，PBS 配制的，滤过除菌，预温至 37℃

15ml 和 50ml 聚丙烯锥底离心管，冰上预冷

无菌橡皮细胞刮子

步骤

1）处死小鼠，无菌分离股骨或胫骨，剔除肌肉和结缔组织，放入盛有无菌 PBS 的小皿中。

2）用 1ml 注射器吸取 1ml DMEM-0。将针头插入骨髓腔（股骨或胫骨）内，冲洗骨髓。重复冲洗直至骨髓腔变白。

3）将冲洗的骨髓通过 200 目的钢网过滤，获得单细胞悬液，加入冰上预冷的 50ml 锥底离心管中。

4）室温下 500*g* 离心 10min，弃上清，收集骨髓细胞。加入 3～5ml DMEM-0 重悬细胞沉淀。

5）在 15ml 离心管底部加入 5ml 淋巴细胞分离液，将 5ml 骨髓细胞悬液轻轻叠加其上。

6）室温下 500*g* 水平离心 20min，缓慢减速。

7）用吸管轻轻吸取界面层单个核细胞，移入一干净的离心管中。

8）4℃下 500*g* 离心 10min，弃上清。用 DMEM-0 洗涤细胞，将细胞重悬于 DMEM-10 中，调整骨髓单个核细胞浓度至 5×10^6 个/ml。

9）将 1×10^7～3×10^7 个骨髓单个核细胞加入 $25cm^2$ 细胞培养瓶中，然后加入 10ml 含 CSF 或 IL-3 的 DMEM-10。细胞置 37℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24h。

10）吸弃悬浮细胞，加入 10ml 含集落刺激因子的 DMEM-10，置 37℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养 7d 诱导巨噬细胞分化。期间第 3 天，用含集落刺激因子的 DMEM-10 换液。

11）吸弃细胞培养上清，加入 15ml PBS 洗涤贴壁的巨噬细胞。

12）吸弃 PBS。加入 5ml 中性蛋白酶消化液，37℃消化 5min。

13）轻拍培养瓶侧面振松细胞，用无菌橡皮细胞刮子沿同一方向轻轻刮下巨噬细胞。

14）加入 10ml DMEM-10 培养基，收集刮下的巨噬细胞至一干净的离心管。

15）4℃下 500*g* 离心 10min，弃上清。用 3～5ml DMEM-10 培养基重悬巨噬细胞并计数。

注意事项

1）一般情况下，5ml 淋巴细胞分离液可分离 5 只小鼠的骨髓细胞，避免超过分离液最高细胞载量。

2）集落刺激因子的最适浓度需通过预实验确定，常用 10ng/ml 的 GM-CSF 及 IL-3 或 500～1000U/ml 的 CSF-1。

3）用无菌橡皮细胞刮子收集贴壁的巨噬细胞时，避免来回刮除，以减少细胞损伤。

第三节　单核巨噬细胞表型检测

单核巨噬细胞具有异质性，不仅表现在巨噬细胞，而且单核细胞也可分为不同的细

胞亚群，有各自特征的表面标志，如静息状态下小鼠单核细胞表型为 Gr-1^{low}CX3CR1^{high}CCR2^{-}CD62L^{-}，相对应的人单核细胞表型为 CD14^{+} CD16^{+} CX3CR1^{high} CCR2^{-}CD62L^{-}；炎症状态下小鼠单核细胞表型为 Gr-1^{high}CX3CR1^{low}CCR2^{+}CD62L^{+}，人炎性单核细胞表型为 CD14^{high}CD16^{-}CX3CR1^{low}CCR2^{+}CD62L^{+}。巨噬细胞异质性更加明显，表现在不仅不同组织来源的巨噬细胞其表面标志不同；同一组织来源的巨噬细胞处于不同分化或活化阶段时，其表面抗原分子的表达也不相同，如经典活化后的巨噬细胞上调 MHC-Ⅱ类分子、共刺激分子和 CD14 等的表达，M2 型活化的巨噬细胞上调甘露糖受体、清道夫受体和某些 FcR 的表达。目前巨噬细胞的鉴定多根据其表面多种抗原分子的表达谱，采用相应特异性单抗，经流式细胞仪直接法或间接法标记进行检测。常用的鉴定巨噬细胞的表面抗原分子有 CD14、CD11b、CD16、CD32、CD64、CD68、F4/80、HLA-DR 等，需注意的是这些分子也表达于多种其他细胞表面，如 CD14 虽主要表达于单核细胞和巨噬细胞，但粒细胞也有表达；HLA-DR 表达于 B 细胞和活化的 T 细胞等；CD16 表达于 NK 细胞；CD32 表达于粒细胞、B 细胞和血小板，在进行结果分析时应特别注意。

一、直接法流式检测巨噬细胞的表型

直接法流式检测利用荧光标记的特异性抗体直接与待测巨噬细胞表面相应抗原分子结合，经洗涤，去除游离荧光抗体后，流式检测细胞表面标记的荧光抗体种类和强度，鉴定巨噬细胞及其分化阶段。直接法操作简便，结果准确，同一细胞群可用多种抗体同时测定，但需注意这些抗体必须标记不同的荧光。实验过程中需同时设同型抗体对照组，其中加入等量荧光标记的同型对照抗体；还需设细胞自发荧光对照管，其中只有待测细胞，不加入任何抗体。碘化丙啶（PI）只能使死细胞着色，利用这一点可排除死细胞对结果的干扰。

材料与试剂

待测细胞悬液

阻断抗体（如正常小鼠 IgG），浓度 1mg/ml

荧光素标记的单克隆抗体（如 FITC-CD14、PE-CD11b 等）

荧光素标记的同型对照抗体

PBS，pH7.2～7.4

步骤

1）调整待测细胞浓度为 1×10^6 个/ml，在每支试管中加入 1ml 细胞悬液。

2）每管加入 4μl 阻断抗体，4℃孵育 10min，阻断非特异性 FcR 结合。

3）加入适量的荧光标记的单抗，终浓度为 5μg/ml，避光冰上标记 15min。

4）每管加入 3ml PBS，200g 离心 5min，弃上清，洗去未结合的游离抗体。

5）重复洗涤细胞 2 或 3 次，弃上清。

6）加入 200μl PBS，混匀细胞，4℃避光待检（上机前加入适量 PI，排除死细胞的干扰）。

注意事项

1）所有荧光抗体的最适工作浓度需根据预实验确定。

2）如进行双标或多标染色，可同时加入几种标记有不同荧光的抗体。

3）样品中含有红细胞时，如新鲜分离的骨髓细胞或脾细胞，需裂解红细胞。

4）荧光抗体染色后应充分洗涤，注意混匀和离心速度，减少细胞团块和碎片。

5）标记好的细胞于4℃保存4h以内，如需延长保存时间，可用甲醛固定，此时每管加入终浓度为2%的甲醛，避光、4℃固定15min，洗涤后待检。

二、间接法流式检测巨噬细胞的表型

间接法流式检测时先将细胞与未标记的特异性一抗混合，洗去未结合游离一抗后，再加入荧光标记的第二抗体，与细胞表面已结合的一抗特异性结合，使待测细胞标上荧光。本方法通用性好，一种荧光标记二抗可与多种一抗联合使用，但由于二抗一般为多克隆抗体，非特异性荧光背景较强，所以实验操作中应设置阴性或阳性对照组。另外，由于间接法洗涤步骤增多，细胞易丢失，细胞数较少的标本应特别注意。

单核/巨噬细胞表达高水平的FcR，进行间接法流式检测时，为避免FcR引起的非特异结合影响实验结果，建议尽量选用荧光标记的一抗，采用直接法检测巨噬细胞表型；或者采用荧光标记的$F(ab')_2$作为二抗，减少FcR的非特异结合。

材料与试剂

待检细胞悬液

阻断IgG，浓度3mg/ml（如二抗来源于羊，则用正常羊血清IgG作为阻断抗体）

未标记一抗（如大鼠抗小鼠CD14、CD11b等）

荧光标记的$F(ab')_2$二抗（如一抗为大鼠抗小鼠，则荧光标记二抗选用抗大鼠IgG）

步骤

1）调整待测细胞浓度为2×10^7个/ml，在每支1.5ml离心管中加入50μl细胞悬液（1×10^6个细胞）。

2）加入0.5μl阻断IgG，4℃孵育10min。

3）加入适量的未标记一抗（终浓度5μg/ml），混匀，4℃孵育15min。设置同型对照组，其中加入等量的同型对照一抗。

4）每管加入500～800μl PBS，500*g*离心3min，弃上清，洗去未结合的游离一抗。

5）每管加入适量的荧光标记的抗$F(ab')_2$段二抗（终浓度5μg/ml），混匀，避光冰上标记15min。

6）每管加入500～800μl PBS，500*g*离心3min，弃上清，洗去未结合的游离荧光二抗。

7）重复洗涤细胞2或3次，弃上清。

8）加入200μl PBS，混匀，4℃避光待检。

第四节　巨噬细胞的活化及相关检测

经典的巨噬细胞活化途径中，在致敏因子如 IFN-γ 的作用下，巨噬细胞首先进入一种无杀伤活性的中间阶段，然后才能被 LPS 等因子激活，完全活化后的巨噬细胞具有较强的抗原提呈能力，分泌大量细胞因子（IL-12、IL-23 等）和趋化因子，产生 NO 和活性氧等活性介质，具有很强的杀伤活性。此为经典途径活化的 M1 型巨噬细胞，在机体抗感染、抗肿瘤中发挥重要作用。IL-4、IL-13 或糖皮质激素等诱导 M2 型巨噬细胞活化，抗原提呈能力较低，不产生 NO，而主要产生多胺和脯氨酸，参与炎症后组织修复而非抗感染免疫；一些诱导巨噬细胞经典活化的刺激因子，在 IgG 的联合作用下，诱导巨噬细胞分泌大量 IL-10、TGF-β 等抑制性细胞因子，下调免疫应答，抑制炎症反应，诱导 Th2 型免疫应答，为Ⅱ型活化的巨噬细胞。活化后的巨噬细胞表型变化可用特异性抗体进行流式标记；分泌功能的变化可用 ELISA 法等检测培养上清中细胞因子、趋化因子的含量，或者用流式细胞仪检测细胞内细胞因子表达的变化。下面主要介绍诱导 M1 型巨噬细胞活化的方法，及活化后巨噬细胞超氧阴离子、NO、杀伤和吞噬功能的测定。

一、巨噬细胞的活化

经典途径活化的巨噬细胞在机体抗感染、抗肿瘤中具有重要作用，下面介绍的方法将巨噬细胞的活化分为致敏和激活两个阶段。经 IFN-γ 等的致敏后，巨噬细胞进入一种无杀伤活性的中间阶段，然后加入 LPS 等激活剂，经过一段时间（48～72h）诱导后，可检测到巨噬细胞对病原体、靶细胞的杀伤或所产生的活性氧介质和活性氮介质。

材料与试剂

静息状态小鼠巨噬细胞

DMEM-10：含有 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基

24 孔细胞培养板

小鼠重组 γ 干扰素（IFN-γ）

E. coli LPS（Sigma），浓度 1μg/ml，RPMI-10 配制

PBS

步骤

1）用 DMEM-10 调整待活化巨噬细胞浓度为 4×10^5 个/ml。在 24 孔板中，每孔分别加入 1ml 细胞悬液。

2）实验分组：对照组、IFN-γ 组、LPS 组、IFN-γ+LPS 组，每组 2 或 3 个复孔。

3）在 IFN-γ 组和 IFN-γ＋LPS 组中，每孔加入终浓度为 2U/ml 的 IFN-γ，置 37℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养 4h，诱导巨噬细胞致敏。

4）弃上清，加入 1ml PBS，洗涤巨噬细胞，重复洗涤 2 次，每孔加入 1ml DMEM-10 培养基。

5）在 LPS 组和 IFN-γ+LPS 组中，每孔加入终浓度为 10ng/ml 的 LPS。置 37℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养 1h，诱导巨噬细胞活化。

6）弃上清，加入 1ml PBS，洗涤巨噬细胞，重复洗涤 2 次，IFN-γ+LPS 组中即为活化的巨噬细胞，加入 1ml DMEM-10 备用。

注意事项

1）根据需要可调整巨噬细胞的起始用量，在 6 孔板或 96 孔板中进行活化。

2）由于巨噬细胞对内毒素非常敏感，所用试剂和培养基应不含内毒素。

3）根据巨噬细胞是否预先接触过某些活化因子、巨噬细胞的来源以及检测巨噬细胞功能时所采用的方法等，诱导巨噬细胞活化的最佳方案需相应调整。

4）不同批次 IFN-γ、LPS 刺激巨噬细胞的最佳浓度应根据预实验确定。

5）细胞内、外的多种因子（如 TNF-α）可作为已致敏巨噬细胞的激活信号，这些分子均可替代 LPS。

6）此方法也可用于炎性巨噬细胞的活化，活化后的炎性巨噬细胞能更有效地杀伤病原体和肿瘤细胞。

二、超氧阴离子的检测

活化后巨噬细胞通过呼吸暴发（respiratory burst）产生大量超氧阴离子，如过氧化离子、H_2O_2 等，在巨噬细胞杀菌过程中起重要作用，呼吸暴发常作为评价巨噬细胞杀伤功能的指标。超氧阴离子不稳定，在其分解过程中可激活鲁米诺类（终浓度为 5～10mol/L）物质并使之发出荧光，实验时将巨噬细胞和鲁米诺发光剂混匀后进行化学发光检测，通过荧光的检测反映超氧阴离子的量。呼吸暴发产生的超氧阴离子也可将无荧光的 2,7′-二氯荧光素二酯（2,7′-dichlorofluorescin-diacetate，DCF-DA）氧化生成具有荧光的 2,7-二氯荧光素（DCF），且 DCF 的量与呼吸暴发的超氧阴离子水平成正比，通过流式或共聚焦显微镜检测荧光的强度可反映超氧阴离子生成的情况。这些方法敏感，并可定量，现已有商品化的试剂盒。

经典的检测方法利用呼吸暴发产生的超氧阴离子氧化细胞色素 c，方法简单，无须特殊的仪器和设备。其原理是利用待测试剂诱导巨噬细胞产生呼吸暴发，所产生的超氧阴离子作用于细胞色素 c，生成的氧化型细胞色素 c 具有颜色，颜色的深浅与超氧阴离子量呈正比。过氧化物歧化酶可以灭活超氧阴离子，细胞色素 c 因此不能被氧化，可作为实验的阴性对照。PMA 或酵母多糖能激发巨噬细胞的呼吸暴发，作为实验的阳性对照。

材料与试剂

巨噬细胞

待测试剂

细胞色素 c 反应液（0.1mol/L）

过氧化物歧化酶

酵母多糖

PBS

Hank's 液

24 孔细胞培养板

步骤

1）在 24 孔细胞中，每孔加 2×10^5 个巨噬细胞，置于 37℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 2～4h，使巨噬细胞贴壁。

2）吸弃上清，用 PBS 洗涤贴壁的巨噬细胞，弃洗液。每孔加 0.1mmol/L 细胞色素 c 反应液 450μl。

3）每孔再加入 50μl 不同稀释度的待测试剂，每稀释度 3 个复孔。另设过氧化物歧化酶阴性对照孔和酵母多糖的阳性对照孔。培养板置 37℃、5% CO_2 细胞培养箱中继续培养 60min。

4）从每孔中取出 250μl 培养上清，加入 250μl 冷的 Hank's 液，在 550nm 处测定光密度值（*D* 值）。超氧阴离子的量（mmol/L）＝（*D* 实验孔－*D* 阴性对照孔）/21.1。

注：21.1 为消光指数 21.1mmol/(L·cm)。

三、一氧化氮的检测

巨噬细胞通过不同的机制杀伤病原体和胞外靶细胞，活性氧介质和活性氮介质是巨噬细胞被激活的重要标志，也是巨噬细胞杀伤肿瘤细胞、细菌等的重要因子，还参与多种生理和病理过程。ROI 包括 H_2O_2、超氧阴离子、单态氧和羟自由基（·OH）等；RNI 包括亚硝酸盐和高活性的一氧化氮（nitric oxide，NO）等。LPS 和 IFN-γ 联合作用于巨噬细胞，细胞中 L-精氨酸胍基上的氨，在 NO 合成酶（nitric oxide synthase，NOS）的催化下产生 NO。值得注意的是，单独 LPS 或 IFN-γ 都不能有效活化巨噬细胞产生 NO。

NOS 是巨噬细胞合成 NO 的限速酶，根据 NOS 的来源及特性将 NOS 分为两种类型：组成型 NOS（constitutive NOS，cNOS）和诱导型 NOS（inducible NOS，iNOS）。cNOS 分布在静息状态的内皮细胞及神经细胞中。在心血管系统，NO 可引起平滑肌的舒张，参与血压调节；在中枢和外周神经系统，NO 可作为神经递质，传递神经信号。iNOS 主要分布在免疫细胞，特别是巨噬细胞中，但静息状态的巨噬细胞不表达 iNOS，在细胞因子或细菌产物的作用下，巨噬细胞中 iNOS 被诱导合成，产生大量 NO，NO 作用于细胞内多种酶的铁-硫中心，形成铁-亚硝酰基复合物，导致酶的失活。这些酶包括参与柠檬酸循环的乌头酸酶、DNA 合成的核糖核苷还原酶以及线粒体呼吸链上的酶，因此通过阻断细胞的能量代谢和 DNA 复制，引起细胞死亡。

巨噬细胞内 iNOS 的合成可利用特异性抗体或引物用 Western 印迹或 RT-PCR 检测 iNOS 蛋白和 mRNA 水平的变化。活化后巨噬细胞分泌 NO 到培养上清中，但 NO 为活化的自由基，含有未配对电子，不稳定，迅速分解成亚硝酸盐和硝酸盐，因此常通过检测亚硝酸盐的含量，间接反映巨噬细胞培养上清中 NO 的分泌水平。操作时将巨噬细胞培养上清（可将上清系列稀释，然后检测）和 Griess 试剂等比例混合，Griess 试剂产

生颜色变化，且与亚硝酸盐含量成正比，根据同时制备的 $NaNO_2$ 标准曲线，即算出样品上清中亚硝酸盐的含量。L-精氨酸类似物，如硝基精氨酸（NNA）和 *N*-单甲基精氨酸（NMMA）能竞争性抑制细胞 NO 的产生，可用作阴性对照。Griess 法有操作简单、所需巨噬细胞较少（可少至 5×10^5 个）、灵敏度高（1μmol/L 左右）等优点。

材料与试剂

小鼠巨噬细胞

含 5%FBS 的 DMEM（DMEM-5）

1mmol/L N^G 单甲基乙酸精氨酸（N^G-monomethyl-L-arginine acetate，L-NMA），PBS 配制，4℃保存

巨噬细胞致敏剂［如小鼠重组 γ 干扰素（IFN-γ）］

0111：B4 型大肠杆菌 LPS（Sigma），TNF-α 或其他激活剂

2mmol/L $NaNO_2$（Sigma），DMEM-5 配制，4℃保存

Griess 试剂（Sigma）：1%盐酸萘乙二胺（naphthylethylenediamine dihydrochloride），用 H_2O 配制；1%磺胺（sulfanilamide），用 5% H_3PO_4 配制，临用前等比例混合

96 孔平底细胞培养板

步骤

1）用 DMEM-5 调整巨噬细胞浓度至 1×10^5 个/ml，在 96 孔平底细胞培养板（简称平底板）中加入 100μl 细胞悬液。分为以下几组：对照组、IFN-γ 组、LPS 组、IFN-γ+LPS 组、L-NMA+IFN-γ+ LPS 组，每组 3 复孔。

2）将 96 孔细胞培养板置 37℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养，使巨噬细胞贴壁（约 2h）。然后用 DMEM-5 培养基轻轻洗涤细胞 2 或 3 次。

3）在各实验孔中加入相应的试剂：IFN-γ 终浓度为 0.1～10U/ml，LPS 终浓度为 1～100ng/ml，L-NMA 终浓度为 50～250μmol/L，终体积 150μl，将细胞继续培养 24～48h。

4）将 $NaNO_2$ 标准品系列稀释（终浓度从 125μmol/L 至 1μmol/L），每孔 100μl 加入另一 96 孔平底板中，即 $NaNO_2$ 标准孔。

5）取各组巨噬细胞培养上清 100μl 加入上述 96 孔平底板中，即各待测孔。

6）在待测孔和 $NaNO_2$ 标准孔中，每孔加 100μl Griess 试剂，室温避光反应 15min。

7）用酶联仪于 550nm 波长处检测各孔的光吸收密度值（OD 值）。

8）根据 $NaNO_2$ 标准品的标准曲线计算样品孔上清中的 NO_2^- 值（μmol/L）。

注意事项

1）IFN-γ 单独作用并不诱导 iNOS 的表达，但 IFN-γ 可协同 LPS 诱导 *iNOS* 基因的表达。

2）不同品系小鼠或巨噬细胞株合成 NO 的能力有差异，LPS 敏感的 C3H/He 小鼠产生较高水平的 NO，LPS 耐受的 C3H/HeJ 小鼠产生的 NO 则较少甚至不产生

NO。P288DI 细胞株经 LPS 刺激不合成 NO，而 RAW264 细胞株可分泌高水平的 NO。

3）应通过预实验确定巨噬细胞致敏和激活所需 IFN-γ 和 LPS 的剂量以及刺激时间。

第五节　巨噬细胞吞噬和杀伤功能的检测

巨噬细胞可非特异吞噬和杀伤细菌或靶细胞，此外抗体可增强巨噬细胞的吞噬和杀伤功能，称为抗体的调理作用，此时抗体与靶细胞表面抗原特异性结合，抗原-抗体复合物通过抗体的 Fc 段与巨噬细胞表面的 Fc 受体（FcR）结合，促进巨噬细胞对靶细胞的吞噬和杀伤。

巨噬细胞非特异吞噬和杀伤功能的经典检测方法是将巨噬细胞与红细胞、细菌等颗粒性物质混合，待巨噬细胞吞噬红细胞、细菌后，将巨噬细胞固定、染色，显微镜下观察巨噬细胞对红细胞、细菌的吞噬情况，判断吞噬功能。此方法简单，无须特殊设备，但主观性强，重复性较差。例如，用荧光素标记细菌或细胞颗粒，然后进行吞噬功能检测，根据巨噬细胞胞质中吞噬的颗粒的荧光强度，反映巨噬细胞的吞噬功能。这种荧光标记的方法操作简单、客观、重复性好，如联合 EB 染料还可进一步区分巨噬细胞内吞的细菌和黏附于巨噬细胞表面的细菌。如果将巨噬细胞和红细胞或细菌继续培养更长一段时间，巨噬细胞可消化被吞噬的红细胞、细菌等，可进一步检测巨噬细胞的杀伤功能。

检测 FcR 介导的巨噬细胞吞噬和杀伤功能时，需先制备抗体调理的靶细胞（即结合有抗体的靶细胞，如抗体结合的 SRBC），然后与巨噬细胞混合，此时常将靶细胞用同位素标记，通过检测靶细胞被杀伤后释放到上清中同位素的放射活性，反映巨噬细胞的吞噬和杀伤功能。

一、巨噬细胞吞噬鸡红细胞

巨噬细胞具有较强的吞噬功能，检测时常用比细菌大的细胞性抗原作为被吞噬的颗粒，红细胞是有核细胞，较易辨别，可作为巨噬细胞吞噬功能检测的靶细胞。实验时将待测巨噬细胞与适量的鸡红细胞混合，置 37℃孵育一段时间（1h），使巨噬细胞吞噬鸡红细胞，然后离心取细胞沉淀制成细胞涂片，染色镜检，观测吞噬有鸡红细胞的巨噬细胞，计算吞噬百分比和吞噬指数。

材料与试剂

鸡红细胞悬液

待测巨噬细胞（可经不同刺激剂处理）

PBS

甲醇

吉姆萨染液

步骤

1）取适量的鸡红细胞，用 PBS 洗涤 2 或 3 次，每次 500g 离心 5min，然后用 PBS 配制 5%（体积比）的鸡红细胞悬液。

2）取 10^6 个经不同条件处理的待测巨噬细胞，用 PBS 稀释至终体积 1ml，加入 5%鸡红细胞悬液（含 $5\times10^6\sim6\times10^6$ 个鸡红细胞），置 37℃水浴中孵育 15～30min，每隔 5min 混匀细胞。

3）500g 离心 10min，去上清，保留约 50μl 液体。

4）用剩余的液体将细胞沉淀混匀，取细胞悬液制备细胞涂片，甲醇固定后吉姆萨染色。

5）在显微镜下计数 200 个巨噬细胞，记录其中吞噬有鸡红细胞的巨噬细胞，结果用吞噬百分率表示，即 200 个巨噬细胞中吞噬了鸡红细胞的巨噬细胞数目；或者用吞噬指数表示，即平均每个巨噬细胞吞噬的鸡红细胞数目。

注意事项

1）实验时应掌握好吞噬时间，若时间过长，红细胞被消化和杀伤；若时间太短，吞噬不充分。

2）巨噬细胞与鸡红细胞孵育时，每隔 5min 混匀细胞，使巨噬细胞充分吞噬鸡红细胞。

3）细胞涂片密度应适度，过密时细胞重叠影响结果判断，细胞过少影响计数。

二、巨噬细胞吞噬 FITC 标记的细菌

巨噬细胞吞噬细菌的检测原理同上，只是用细菌代替鸡红细胞，将待测巨噬细胞与适量的灭活的细菌混合，置 37℃孵育一段时间（1h），使巨噬细胞吞噬细菌，然后离心取待测细胞制成涂片，Diff-Quik 染色后镜检，计算吞噬的百分率和吞噬指数。但结果判断主观性较强，影响因素多，用 FITC 荧光素标记细菌后，再与巨噬细胞混合，吞噬完成后，洗出游离的 FITC 标记细菌，通过流式检测巨噬细胞吞噬的细菌的荧光值反映巨噬细胞吞噬功能。但此方法不能区分被巨噬细胞吞噬的细菌和黏附于巨噬细胞表面的细菌，可联合运用 EB 染料进行染色，其原理是 EB 不能进入巨噬细胞，被吞噬的细菌不能被 EB 着色，荧光显微镜下或流式检测呈现 FITC 的绿色荧光；但 EB 可进入黏附于巨噬细胞表面的细菌，荧光检测时 FITC 的绿色荧光激发 EB 染料，使其发出红色荧光，因此可以区分巨噬细胞内吞的细菌（绿色）和黏附于巨噬细胞表面的细菌（红色）。

材料与试剂

热灭活的细菌，10^9 个/ml

待测巨噬细胞（可经不同刺激剂处理）

FITC（Sigma），0.1mg/ml

含 5%（体积比）FCS 的 PBS，冰上预冷

10mm×75mm 聚丙烯塑料试管，带盖型

70℃水浴

荧光显微镜或流式细胞仪

步骤

1. FITC 标记细菌

1）将对数生长期细菌室温 12 000g 离心 10min，弃上清，调整细菌浓度至 2×10^8 个/ml。

2）加入 1ml FITC 重悬细菌，25℃避光标记 30min，期间不时振荡混匀。

3）加入 10ml PBS，4℃下 6000g 离心 5min，洗涤细菌，去除游离的 FITC，重复洗涤 2 或 3 次，直至上清中不含 FITC。

4）加入适量 PBS 重悬细菌，60℃热灭活 60min。

5）加入 10ml PBS，4℃下 6000g 离心 5min，洗涤细菌，调整细菌浓度至 2×10^8 个/ml，此即 FITC 标记的细菌。

2. FITC 标记细菌的吞噬

1）用 PBS 调整巨噬细胞浓度至 2×10^7 个/ml，在 10mm×75mm 带盖塑料试管中加入 0.1ml 细胞悬液。

2）用 PBS 调整单细菌悬液至 2×10^8 个细菌/ml。

3）在上述含巨噬细胞的塑料试管中，加入 0.1ml 细菌悬液（每管 2×10^7 个细菌）。

4）加入 50μl 预冷的血清，再加入 PBS 至终体积 1ml，盖紧管盖，置于 37℃水平摇床上慢速摇动 20～30min，使巨噬细胞充分吞噬 FITC 标记细菌。

5）4℃下 250g 离心 5min，弃上清。加入冰预冷的 PBS，混匀细胞，重复洗涤细胞 2 或 3 次，彻底除去胞外未被吞噬的 FITC 标记细菌。

6）用冰预冷的 5%FCS/PBS 重悬巨噬细胞，调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml。

7）加入 EB 使终浓度为 50μg/ml，混匀。

8）立刻取 10～20μl 细胞悬液滴在载玻片上，置荧光显微镜下观测。记录 200 个含细菌的巨噬细胞，鉴别被巨噬细胞吞噬的细菌（绿色荧光）和黏附于巨噬细胞表面的细菌（红色荧光）。计算吞噬指数：吞噬指数＝阳性吞噬细胞百分率×阳性细胞中平均细菌数。

注意事项

1）EB 染色后应立即进行观测，随着时间的延长，EB 会缓慢进入巨噬细胞，使内吞的细菌也呈现为红色，但所需时间较长。

2）巨噬细胞和 FITC 标记细菌的最佳比例需通过预实验确定，一般为 1∶10～1∶20。

3）巨噬细胞和 FITC 标记细菌的最佳吞噬时间是实验成功的关键因素之一，可在 1h 内每隔 10～15min 连续取点进行监测。

三、巨噬细胞杀伤功能的检测

细菌与巨噬细胞混匀后，延长作用时间，吞噬的细菌可被巨噬细胞杀伤，如延长孵

育时间后细菌克隆数减少，表明细菌被巨噬细胞杀伤。具体方法如下，细菌与巨噬细胞混匀、吞噬后，用水裂解巨噬细胞，释放其中的细菌，系列稀释后，将细菌涂布于细菌培养板，过夜培养后，计数菌落数。将吞噬有细菌的巨噬细胞继续孵育一段时间，胞内细菌被杀伤，此时再用水裂解巨噬细胞，释放细菌，将细菌涂布于细菌培养板，比较杀伤前后细菌菌落数的变化，反映巨噬细胞对细菌的杀伤功能。

材料与试剂

李斯特菌悬液，对数生长期

胰蛋白胨肉汤

待测巨噬细胞

正常血清，新鲜分离或新鲜融解，置冰上备用

含5%（质量体积比）正常血清的PBS，冰上预冷

10mm×75mm带盖的聚丙烯锥底塑料试管

70℃水浴

细菌培养板，4℃储存，用前预温至37℃

步骤

1. 热灭活李斯特菌的制备

1）将适量细菌接种到胰蛋白胨肉汤中，在37℃水浴中振荡培养至对数生长期（4～6h）。

2）将对数生长期细菌置70℃水浴，热灭活60min，制备热灭活细菌。

3）4℃下6000g离心10min，弃上清。加入10ml PBS洗涤细菌。

4）最后用PBS重悬细菌，调整浓度至约10^{10}个/ml。

2. 巨噬细胞吞噬细菌的检测

1）在10mm×75mm带盖塑料试管中分别加入下列成分：2×10^6个巨噬细胞悬液、2×10^7个热灭活的细菌、50μl正常血清，补充PBS至终体积为1ml。

2）将试管置37℃水平摇床上慢速摇动15～20min，使巨噬细胞充分吞噬细菌。

3）加入PBS洗涤去除未被吞噬的细菌，将细胞重悬于1ml含5%血清的PBS中。

4）将吞噬细菌后的巨噬细胞悬液进行10倍系列稀释，即先在各试管中加入0.9ml无菌水，接着在第一支试管中加入0.1ml巨噬细胞悬液（水可裂解巨噬细胞），混匀后取0.1ml细胞悬液加入第二支试管中，混匀后再取0.1ml细胞悬液依次稀释。

5）充分混匀后，从各试管中取0.1ml液体分别涂布于细菌培养板上。

6）将步骤3）中剩余的巨噬细胞悬液，置37℃继续孵育90～120min，使巨噬细胞杀伤胞内细菌。

7）同步骤4）和5），将巨噬细胞悬液进行10倍系列稀释，并涂布于细菌培养板上。

8）将细菌培养板倒置于37℃细菌培养箱，培养24h。计数细菌克隆数，比较巨噬细胞杀伤前后细菌克隆数的变化。

注意事项

1）巨噬细胞杀伤胞内细菌的最适时间，需根据不同的巨噬细胞株及靶细菌的种类做相应调整。

2）细菌培养使用标准37℃细菌培养箱，而非CO_2饱和湿度的细胞培养箱，避免湿度过高。

四、Fc受体介导的吞噬作用

巨噬细胞表达高水平的Fc受体（FcR），通过与抗体的Fc段结合，促进对表达特异性抗原的病原体或靶细胞的吞噬。不同刺激剂或细胞因子可通过调控巨噬细胞表面FcR的表达，影响巨噬细胞的功能。本实验中，抗绵羊红细胞（SRBC）抗体（即调理素）与SRBC结合，形成抗原-抗体复合物，通过抗体的Fc段与巨噬细胞表面的FcR结合，诱导巨噬细胞对SRBC的吞噬。实验前，将SRBC用同位素^{51}Cr标记，然后与调理素结合后，再与巨噬细胞混合，用红细胞裂解液裂解胞外未吞噬的和黏附于巨噬细胞表面的SRBC后，洗去上清中的同位素，用5%SDS继续裂解巨噬细胞，被巨噬细胞吞噬的SRBC释放^{51}Cr到培养上清中，检测上清中^{51}Cr的放射活性即可反映FcR的表达情况和其介导的吞噬功能。

材料与试剂

SRBC

生理盐水

0.1mCi铬酸钠（$Na_2{}^{51}CrO_4$），生理盐水配制

多克隆抗SRBC抗体（调理素）

巨噬细胞或巨噬细胞株（如RAW264.7）

待测试剂

RPMI-5完全培养基：含5%FBS的RPMI 1640培养基

ACK裂解液：1.66g NH_4Cl（终浓度31mmol/L）、0.2g $KHCO_3$（终浓度2mmol/L），加入40μl 0.5mol/L EDTA（终浓度20μmol/L），补加水至1L

0.5%（质量体积比）SDS溶液

96孔细胞培养板

γ液闪仪和γ闪烁管

步骤

1. 同位素标记SRBC及SRBC与调理素结合

1）用生理盐水洗涤SRBC，调整浓度至1×10^{10}个/ml。

2）在50ml锥底离心管中加入1×10^{9}个SRBC、100μCi铬酸钠和调理素，加入生理盐水至终体积5ml，轻轻混匀。

3）置37℃水浴1h，每隔10min轻摇试管，混匀红细胞，均匀标记同位素。

4）加入25ml生理盐水，室温下300g离心10min。轻轻吸弃上清（注意：上清含

同位素），重复洗涤 2 或 3 次，洗去游离的 $Na_2{}^{51}CrO_4$ 和调理素。

5）用 25ml 培养基重悬红细胞，此即为同位素标记且经抗体调理后的 SRBC，4℃备用。

2. Fc 受体介导的吞噬作用

1）在 96 孔培养板每孔中加入 2×10^4 个巨噬细胞，总体积 100μl，置细胞培养箱中培养 2h，直至细胞贴壁。

2）加入不同浓度的待测试剂，置细胞培养箱中培养 18～24h，以调节巨噬细胞 FcR 的表达。

3）轻轻吸弃 96 孔培养板中的培养上清，每孔加入 100μl 同位素标记且抗体调理后的 SRBC 悬液，孵育 1h，使巨噬细胞充分吞噬 SRBC。

4）离心后小心吸弃上清。加入 100μl 培养基洗涤细胞，弃上清，加入 100μl ACK 裂解液，裂解 SRBC。

5）彻底吸弃 ACK 裂解液。加入 100μl 培养基洗涤细胞，弃洗液。加入 100μl 5% SDS，室温作用 5～10min，裂解巨噬细胞。

6）将巨噬细胞裂解液上清加入 γ 闪烁管，用液闪仪检测。

7）结果用 SRBC 吞噬值表示：SRBC 吞噬值＝样品 cpm 值×4 000 000/100μl SRBC 的最大释放 cpm 值。

8）SRBC 的最大释放 cpm 值测定方法：将 100μl SRBC 悬液加到 SCS 滤纸上（SRBC 裂解后释放其中的 $Na_2{}^{51}CrO_4$），放入计数管中，进行液闪仪检测。

注意事项

1）通过预实验确定调理素的最适工作浓度，此时巨噬细胞具有最大吞噬活性。

2）制备好的抗体调理且经同位素标记的 SRBC，4℃可保存几小时。

3）通过预实验确定吞噬作用最佳的孵育时间（可能从 30min 到 3h）。

4）IFN-β 能显著上调巨噬细胞 FcR 的表达，可作为阳性对照。

5）裂解液作用于 SRBC 的时间很关键，时间过短 SRBC 裂解不充分，时间过长会引起巨噬细胞裂解，因此时间以恰好完全裂解 SRBC（10～60s）为宜。裂解期间需不断混匀 96 孔培养板，使裂解液充分作用于 SRBC，可镜下观察控制裂解时间，特别注意孔底以及巨噬细胞间的 SRBC 是否被裂解。

6）实验者须经严格培训后方可进行同位素 ^{51}Cr 的操作。操作人员在整个实验过程中应严格遵循实验规程，避免不必要的同位素暴露，同时还应防止同位素沾染仪器设备。

五、FcR 介导的黏附作用

下文介绍的方法检测巨噬细胞表面 FcR 介导的黏附作用，常用来检测某待测试剂是否影响巨噬细胞 FcR 的表达。碘乙酸（iodoacetic acid，IAA）可抑制巨噬细胞的吞噬作用，因而可以排除吞噬的干扰，检测 FcR 介导的黏附作用。实验时先加入碘乙酸，然后将巨噬细胞与同位素标记且抗体调理后的 SRBC 混匀，孵育一段时间后，彻底洗去

未黏附的 SRBC，加入 5%SDS 裂解巨噬细胞及 SRBC，检测上清中 SRBC 释放的^{51}Cr，代表巨噬细胞的黏附功能。

材料与试剂

150mmol/L 碘乙酸
巨噬细胞
待测试剂
5%SDS
24 孔细胞培养板

步骤

1）制备巨噬细胞悬液，调整浓度至 4×10^5 个/ml。在 24 孔板中加入 500μl 细胞悬液。置细胞培养箱中培养 2～3h，使细胞贴壁。
2）巨噬细胞贴壁后，弃上清，加入适当浓度的待测试剂，作用一段时间。
3）制备同位素标记且抗体调理的 SRBC。
4）取 9.9ml SRBC 悬液，加入 0.1ml 150mmol/L 碘乙酸。
5）吸弃巨噬细胞培养上清，加入 500μl 碘乙酸处理后的 SRBC 悬液，孵育 1h。
6）轻轻吸弃未黏附的 SRBC 悬液。沿孔壁缓慢加入 500μl 培养基洗涤的巨噬细胞，重复洗涤 3 次，彻底洗去未黏附的 SRBC。
7）加入 500μl 浓度为 5%的 SDS，轻摇混匀培养板约 10min，充分裂解 SRBC 和巨噬细胞。
8）吸取 400μl 细胞裂解上清，加入到相应的 γ 计数管中，用液闪仪检测各孔的 cpm 值。

注意事项

1）待测试剂的浓度和作用时间需根据预实验调整。
2）应充分洗去未黏附的 SRBC，以免影响实验结果。
3）加入 SDS 后应混匀，充分裂解 SRBC 和巨噬细胞。
4）注意将 400μl 裂解液的 cpm 值换算成 500μl 裂解液总量的 cpm 值。

第六节　巨噬细胞抗肿瘤活性的检测

单核巨噬细胞除了能够通过抗体依赖细胞介导的细胞毒作用（ADCC）杀伤多种靶细胞外，还能直接杀伤肿瘤细胞，特别是细胞因子活化后的巨噬细胞具有更强的抗肿瘤活性。检测时，活化后巨噬细胞和靶细胞共培养一段时间，检测靶细胞的杀伤情况反映巨噬细胞的抗肿瘤活性。

杀伤后靶细胞的检测有多种方法，如 LDH 释放法、Hoechst 33342（H33342）标记法、^{51}Cr 铬酸钠释放法等。LDH 是细胞胞质中的乳酸脱氢酶，当细胞被杀伤时可释放到细胞外，所以细胞死亡数目与上清中 LDH 的活性成正比，测定 LDH 活性，可计算巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤百分率。LDH 释放法的优点在于自然释放率低；可检测大

量样本，实现高通量检测；无须预标记靶细胞，避免^{51}Cr释放法中同位素的放射性污染。但是LDH是细胞本身生长代谢的产物，巨噬细胞也会释放不同程度的LDH，干扰实验结果。^{51}Cr释放法被认为是检测巨噬细胞杀伤的金标准，敏感、特异，但存在放射性污染。H33342标记法等荧光测定法检测巨噬细胞杀伤活性是近年来发展起来的方法。其原理与^{51}Cr释放法基本相同，用特异性荧光染料如H33342标记靶细胞，巨噬细胞杀伤靶细胞后，检测培养上清中的荧光水平，随着荧光测定仪器的普及和新的荧光标记物的运用，荧光测定法有取代^{51}Cr释放法的趋势。

一、H33342释放法检测巨噬细胞对靶细胞的杀伤

H33342为DNA的特异性荧光染料，可用其标记肿瘤细胞以检测巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤效应。被杀伤的靶细胞DNA断裂后，H33342释放到培养上清中，巨噬细胞的杀伤活性与上清中荧光强度成正相关，因此可通过测定上清中的荧光强度反映巨噬细胞的杀伤功能。操作过程中应同时设置自发释放组和最大释放组，其中只有标记的靶细胞，无巨噬细胞。实验结束时，对于自发释放组，可直接测定自发释放孔上清中的荧光强度；对于最大释放组，需在最大释放孔中加入1%Triton X-100裂解靶细胞，使靶细胞中的H33342完全释放，然后检测荧光强度，即最大释放值。

材料与试剂

待测巨噬细胞（可经相应活化剂处理）
靶细胞（如L929细胞株）
H33342
1%Triton X-100
微量荧光测量板（德国Dynatech公司产品）
自动微量荧光分析仪（Micro-Fluo Dynatech）

步骤

1）调整靶细胞浓度至1×10^7个/ml，加入终浓度为10μmol/L的H33342，置37℃标记2h。
2）加入DMEM离心洗涤荧光标记的靶细胞，充分洗涤2或3次，彻底洗去游离的H33342。
3）调整巨噬细胞浓度为1×10^6个/ml，在96孔圆底培养板中加入100μl/孔。
4）按巨噬细胞：靶细胞为10：1～50：1，加入标记后靶细胞，每孔100μl，每浓度3个复孔，混匀后，将96孔板置37℃、5%CO_2细胞培养箱中培养24～48h。
5）同时设自发释放孔和最大释放孔，其中只加入等量的标记后靶细胞。
6）实验结束前，在最大释放孔中加入1%Triton X-100完全裂解靶细胞。
7）将96孔板室温下500*g*离心5min，从每孔取100μl培养上清，分别加至96孔荧光测量板。
8）用荧光分析仪测定各孔的OD值，激发波长为360nm，发射波长450nm。计算巨噬细胞杀伤活性：单核细胞杀伤活性（%）＝［（实验组OD值－自然释放组

OD 值）/（最大释放组 OD 值－自然释放组 OD 值）］×100。

二、^{51}Cr 释放法检测巨噬细胞对靶细胞的杀伤

^{51}Cr 释放法是测定巨噬细胞杀伤功能的经典方法，实验前用同位素^{51}Cr 铬酸钠（$Na_2{}^{51}CrO_4$）标记肿瘤靶细胞，再以一定的效靶比（效应细胞：靶细胞，即 E：T）混合效应细胞（巨噬细胞）和肿瘤靶细胞。巨噬细胞和肿瘤靶细胞共培养一段时间后，肿瘤靶细胞被杀伤，肿瘤靶细胞内 $Na_2{}^{51}CrO_4$ 释放到培养上清中。测定上清中的同位素即可反映巨噬细胞的抗肿瘤活性和杀伤功能。巨噬细胞杀伤常用的肿瘤靶细胞有 P815、L-929 和 WEHI-164。此方法结果准确、重复性好，但存在放射性污染。

材料与试剂

肿瘤靶细胞：如 P815

0.1mCi 铬酸钠

巨噬细胞株或新鲜分离的巨噬细胞

待测试剂

无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 PBS 缓冲液

RPMI-10：含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基

10%（质量体积比）SDS

96 孔圆底培养板

步骤

1. ^{51}Cr 标记 P815 靶细胞

1）制备 P815 靶细胞悬液，调整浓度为 5×10^5 个/ml。

2）取 1×10^6 个细胞加入 50ml 锥底聚丙烯塑料离心管中，加入 100μCi 铬酸钠，37℃水浴标记 1h，每 5～10min 混匀细胞。

3）加入 25ml RPMI-10 培养基，室温下 300*g* 离心 5min，弃上清。重复洗涤细胞 2 或 3 次，彻底洗去游离的^{51}Cr。

4）300*g* 离心 5min，弃上清。小心地用 RPMI-10 培养基悬浮细胞，调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml 左右。

2. 巨噬细胞杀伤 P815 细胞

1）用 RPMI-10 调整巨噬细胞浓度至 2×10^6 个/ml。每孔加入 100μl 巨噬细胞悬液，培养 2h，使细胞贴壁。

2）用 PBS 洗涤巨噬细胞各孔 2 或 3 次，洗去悬浮细胞。

3）在 96 孔板中加入不同稀释度的待测试剂，每组 3 个复孔，培养一段时间。

4）用 PBS 洗涤细胞 2 或 3 次，彻底吸弃孔中残存的洗液。

5）每孔加入 200μl ^{51}Cr 标记的靶细胞（浓度为 1×10^5 个/ml），效靶比为 5：1～20：1。设置阴性对照组（自然释放）和阳性对照组（最大释放），其中只加入标记的靶细胞。每组设 3 个复孔。培养 18～24h，使巨噬细胞充分杀伤靶细胞。

6）将培养板 300g 离心 5min。取 100μl 细胞培养上清，包括 3 个自然释放孔，分别加入相应的 γ 计数管中。最大释放孔中加入 5% SDS 10μl，待靶细胞溶解后，取 100μl 培养上清加入 γ 计数管中。

7）测定各孔上清的 cpm 值，计算巨噬细胞杀伤活性：杀伤活性（%）＝［（实验组 cpm－自发释放组 cpm）/（最大释放组 cpm－自发释放组 cpm）］×100。

注意事项

1）^{51}Cr 的半衰期只有 27.8d，^{51}Cr 标记细胞时应根据半衰期精确计算标记时^{51}Cr 的实际放射活性。

2）^{51}Cr 可非特异标记死细胞，因此应选用对数生长期、状态良好的靶细胞进行标记，可在实验前每两天将细胞传代，确保实验时 P815 细胞处于最佳生长状态。

3）标记时，操作宜轻柔；标记后应充分洗涤靶细胞，且标记好的靶细胞应尽快使用。

4）标记后靶细胞可用 20ml 培养基重悬，置 37℃水浴 30min，使细胞质中的同位素完全掺入 DNA 中，有利于减少非特异的自发释放。

5）由于培养板四周边缘孔液体容易挥发，应避免使用，或者可以在四周边缘孔中加入适量培养基，减少实验孔的液体挥发。

6）为避免细胞丢失，可将 96 孔细胞培养板离心后再吸弃洗液。

7）巨噬细胞杀伤活性低时，可通过调整待测试剂的浓度、延长试剂“活化”巨噬细胞的时间、调整效靶比、延长巨噬细胞“杀伤”靶细胞的时间或更换更敏感的靶细胞来改善。

8）巨噬细胞的最适浓度应根据具体情况而定，96 孔培养板中每孔约 2×10^5 个细胞。

9）检测时效靶比很关键，应先用不同的效靶比（1∶1、2∶1、5∶1、10∶1、20∶1、50∶1、100∶1 等）进行预实验以确定最适的效靶比。

第七节　单核巨噬细胞趋化功能的检测

单核巨噬细胞趋化功能的检测包括两个方面的内容，一方面是在趋化因子的作用下，巨噬细胞被趋引到病灶部位；另一方面是活化后的巨噬细胞分泌多种趋化因子，对白细胞、NK 细胞等免疫细胞具有趋化效应。本节主要介绍巨噬细胞对趋化因子的反应，活化后巨噬细胞分泌的趋化因子检测可通过 ELISA 或 Western 印迹从蛋白质水平检测、通过 PCR 从 mRNA 水平检测，也可用趋化实验检测巨噬细胞分泌的趋化因子的趋化效应，趋化因子与相应的受体结合引起的细胞内信号转导激活可参见本书相应章节。

MCP-1（monocyte chemoattractant protein-1）、MCP-2、MCP-3、MIP-1α（macrophage inflammatory protein-1α）、MIP-1β 对单核巨噬细胞具有很强的趋化和活化作用，可趋化单核巨噬细胞并诱导巨噬细胞活化，使其胞质内 Ca^{2+} 浓度升高、释放超氧阴离子、上调黏附分子的表达和细胞因子（如 IL-1、IL-6 等）等的产生。巨噬细胞趋化活性的检测可用琼脂糖法和趋化小室法，后者常用且方法敏感，能检测出纳克水平的趋化

因子活性，且时间短、重复性好。趋化小室由上、下两室组成，两室间用一层聚碳酸酯膜（polycarbonate membrane）分隔。在下室加入 MCP-1 或待测趋化因子，上室加入巨噬细胞等待测细胞，趋化因子在膜的两侧形成浓度梯度，细胞从上室低浓度处向下室趋化、移动，计数下室的细胞量可反映趋化因子对细胞的趋化能力。趋化的细胞较少时，可将膜取下，直接染色记数，若趋化的细胞较多，可在 24 孔板中加入 500μl 含 0.5mg/ml MTT 的完全培养基，将小室置于其中，使膜浸没在 MTT 培养基中，37℃ 4h 后取出。然后加入 500μl DMSO，将小室置于其中，使膜浸没在 DMSO 中，振荡 10min，使甲臜充分溶解。取出小室，24 孔板于酶标仪上测 OD 值。若细胞趋化后落入下室，可直接计数，或用荧光抗体标记后检测被趋化细胞的种类和数量。*N*-甲酰甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸（*N*-formylmethionyl-leucyl-phenyl-alanine，fMLP）对细胞有很强的非特异趋化作用，常作为阳性对照。根据所检测细胞的不同，应选择不同孔径的聚碳酸酯膜，常用膜的孔径有 3μm、5μm、8μm，淋巴细胞常采用 3μm 孔径的膜，单核巨噬细胞则采用 5～8μm 孔径的膜。

材料与试剂

待测巨噬细胞
待测趋化因子
PBS 液（pH7.2）
fMLP
5%FBS 的 DMEM 培养液
24 孔趋化小室（Corning）
甲醇
吉姆萨或瑞氏染色液

步骤

1）取待测巨噬细胞，用含 5%FBS 的 DMEM 培养液洗涤 2 次，调整细胞浓度至 1×10^7 个/ml。
2）在趋化小室的下室分别加入 600μl 阳性对照（fMLP，50～100nm）、阴性对照（培养基）及不同浓度的待测趋化因子，每浓度 3 个复孔。
3）盖上趋化小室的上室部分，加入 100μl 巨噬细胞悬液。
4）置 37℃、5%CO_2 细胞培养箱中静置培养 2h。
5）去除上室细胞，将膜取出，小心地将滤膜浸入甲醇中，室温固定 3min，将滤膜取出，自然干燥。
6）将滤膜在吉姆萨染色液中染色 30min，自来水冲洗，置于玻片上，显微镜下观察。
7）高倍镜下计数每张膜中的细胞数，计算移动指数：移动指数＝实验组细胞数/阴性对照组细胞数。

注意事项

1）趋化因子活性强，有时较高浓度时趋化作用反而降低，所以待测样品常需连续

5 倍或 10 倍系列稀释以获得最佳趋化效果。趋化因子的常用浓度为 0.01～100nmol/L，但最适浓度应根据预实验相应调整。

2）因气泡会影响细胞的趋化，操作时下室液体和膜之间不应有气泡，且上室、下室液体之间不应互相流通。

3）待测巨噬细胞的最佳浓度和最佳趋化时间应根据预实验相应调整，一般单核巨噬细胞为 2～4h。

4）孵育过程中不应移动小室，以免破坏趋化因子浓度梯度，影响实验结果。

5）若黏附于膜上的细胞数量较多，影响计数，可用 5mmol/L EDTA 将细胞从膜上消化下来，然后计数下室中的细胞数。

第八节 结　　语

单核巨噬细胞是天然免疫系统的主要组成部分，在正常情况下，单核吞噬细胞在清除体内细胞碎片、衰老及凋亡的细胞，维持机体内环境的稳定方面发挥着巨大作用。病原体入侵或机体非病原体性炎症刺激可诱导巨噬细胞活化，在最初的非特异免疫应答阶段，巨噬细胞直接吞噬和清除病原体，同时将抗原信息以 MHC-抗原肽的形式提呈给抗原特异性 Th 细胞，诱导特异性免疫应答，此时的巨噬细胞作为抗原提呈细胞发挥作用，上调 MHC-Ⅱ分子和共刺激分子的表达（如 CD80、CD86、CD40），抗原提呈功能增强。因此巨噬细胞既是吞噬细胞又具有抗原提呈功能，巨噬细胞的吞噬功能可通过经典的鸡红细胞吞噬实验或吞噬荧光标记的细菌或粒子进行流式检测；巨噬细胞表面共刺激分子、受体等表达的变化同样可用流式细胞仪检测；有关巨噬细胞抗原提呈功能检测请参见第二章；有关巨噬细胞活化后信号转导的检测请参见第二十七章。巨噬细胞分泌细胞因子的检测可用 ELISA 检测上清中相应细胞因子的分泌水平，但检测的是一群细胞产生的细胞因子总量，若需分析单一巨噬细胞活化后产生细胞因子的能力，可用 ELISPOT 技术（参见第十四章）。检测巨噬细胞内细胞因子的分泌可用 Brefeldin A 阻断细胞因子的分泌途径，使细胞因子在细胞内累积，然后用荧光素标记的抗细胞因子抗体，采用流式法进行检测。流式法可进一步扩展采用多色荧光标记，分析同一巨噬细胞分泌的不同细胞因子，或比较不同巨噬细胞分泌的同一细胞因子。PCR、RT-PCR 或荧光定量 PCR 可以对巨噬细胞分泌的细胞因子 mRNA 进行检测，可检测一种或多种基因转录水平的变化。

活化后的 Th 细胞启动特异性免疫应答，包括特异性细胞免疫和特异性体液免疫。体液免疫中活化的 B 细胞分泌抗体，抗体与病原体表面抗原特异性结合后，通过抗体 Fc 段与巨噬细胞表面 FcR 结合，显著增强巨噬细胞的吞噬和杀伤功能，即抗体依赖细胞介导的细胞毒作用（ADCC）和抗体的调理作用。特异性细胞免疫中，活化的 T 细胞分泌大量细胞因子和趋化因子，使巨噬细胞向病灶部位趋化，因此巨噬细胞的趋化功能是巨噬细胞功能检测的一个重要方面，单核巨噬细胞趋化功能障碍与多种疾病相关。在 T 细胞分泌的多种细胞因子作用下，巨噬细胞可充分活化，如 IFN-γ 和 LPS（或 TNF-α）联合作用，诱导经典途径的巨噬细胞活化，即 M1 型巨噬细胞活化，活化后的巨噬细胞分

泌多种细胞因子（如 IL-1、IL-6、IL-12、IL-23 等）和趋化因子（如 IL-8、IP-10、MIP-1、RANTES）诱导炎症反应，趋化中性粒细胞、DC、NK 细胞、T 细胞等参与免疫应答。有关细胞因子和趋化因子的检测参见第九章。M1 型巨噬细胞活化的另一个特征性变化是巨噬细胞合成 NOS 增加，分泌大量 NO，在巨噬细胞抗感染、抗肿瘤中起关键作用。有关 NOS 的检测可从 mRNA 水平和蛋白质水平，用 RT-PCR 和 Western 印迹检测，本章介绍的巨噬细胞培养上清中 NO 检测方法使用 Gress 试剂，方法简单、灵敏度高。活化后的 T 细胞还可分泌 IL-4、IL-10 等 Th2 型细胞因子，在这些 Th2 型细胞因子的作用下，巨噬细胞上调甘露糖受体和某些趋化因子（如 CCL22、CCL18、CCL17、AMAC-1 等）的表达，释放抑炎细胞因子 IL-10 和 TGF-β 等；上调精氨酸酶合成大量多胺（而非 NO），通过促进成纤维细胞增殖、血管生成等参与伤口愈合、组织修复等，即 M2 型活化的巨噬细胞。第 3 种巨噬细胞的活化类型，即Ⅱ型活化的巨噬细胞，主要分泌 IL-10、TGF-β，诱导 Th2 型免疫应答，表现为抑制炎症反应和 Th1 细胞介导的免疫应答，具有很强的免疫负调节功能，防止机体免疫系统过度活化。因此巨噬细胞在炎症早期启动和扩大免疫应答，有效清除病原体或恶变的细胞，在炎症后期，则通过多种机制参与组织损伤修复，并使机体的免疫应答处于一种适度的活化状态，防止过度活化，使机体免疫应答趋于平复，参与免疫稳态的维持。

巨噬细胞最主要的功能是吞噬和杀伤病原体、肿瘤细胞等靶细胞，这也是本章介绍的重点。巨噬细胞功能检测的起点是有效分离和纯化巨噬细胞，根据不同的实验目的和要求，方法各异。人外周血单核巨噬细胞的分离，常先用密度梯度离心法分离到单个核细胞（PBMC），然后用贴壁法、磁珠分选法或流式分选法纯化巨噬细胞，其中流式分选法得到的巨噬细胞纯度最高，但耗时长；磁珠分选纯化的巨噬细胞可满足大多数实验的需要；贴壁法一般用于巨噬细胞的初步纯化，其纯度最低。静息状态的巨噬细胞吞噬和杀伤功能较弱，细胞因子活化后的巨噬细胞具有很强的吞噬和杀伤功能，鸡红细胞吞噬实验简单，无需特殊设备，但结果判断主观性强，已逐渐被荧光标记的细菌或粒子流式检测替代。本章介绍了一种联合应用 EB 染料和 FITC 标记的细菌区分巨噬细胞吞噬的细菌和黏附于巨噬细胞表面的细菌的方法。利用碘乙酸抑制巨噬细胞吞噬功能，可检测巨噬细胞的黏附功能。延长巨噬细胞与细菌混合时间，可检测巨噬细胞对细菌等的杀伤作用，通过检测杀伤前后细菌菌落数量的变化，反映巨噬细胞的杀伤功能。巨噬细胞抗肿瘤活性检测，则先用同位素标记靶细胞，然后将巨噬细胞与靶细胞混合孵育，靶细胞被杀伤后，将同位素释放到培养上清中，通过检测上清中同位素的量反映巨噬细胞的杀伤活性，此方法敏感、重复型好，目前常用，但需要同位素防护。

总之，巨噬细胞功能多样，检测方法各异，且各种检测方法发展很快，总的趋势是更灵敏、更简便、更客观、更全面。巨噬细胞功能检测一方面可用来反映机体免疫系统，特别是天然免疫的功能状态；另一方面，在科研实践中，常通过检测某种因子对巨噬细胞功能的影响，研究巨噬细胞的功能或为巨噬细胞相关疾病的防治寻找潜在的靶标。

（于益芝　徐红梅）

参 考 文 献

科利根 JE，比勒 BE，马古利斯 DH，等. 2009. 精编免疫学实验指南. 曹雪涛，于益芝，孙卫民，等译. 北京：科学出版社.

柳忠辉. 2002. 免疫学常用实验技术. 北京：科学出版社.

Anderson CF, Mosser DM. 2002. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. J Leukoc Biol, 72(1):101～106.

Burow S, Valet G. 1987. Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (DCF). Eur J Cell Biol, 43(1):128～133.

Chizzolini C, Rezzonico R, De Luca C, et al. 2000. Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. J Immunol, 164(11):5952～5960.

Coligan J E. 2007. Current Protocols in Immunology. USA: John Wiley and Sons.

Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, et al. 2001. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium* tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. J Exp Med, 194(8):1123～1140.

Fogg DK, Sibon C, Miled C, et al. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. Science, 311(5757):83～87.

Geissmann F, Jung S, Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity, 19:71～82.

Gordon S, Taylor PR. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol, 5(12):953～964.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2005. The B7 family revisited. Annu Rev Immunol, 23:515～548.

Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, et al. 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. J Immunol, 167(11):6533～6544.

Kawai T, Akira S. 2007. TLR signaling. Semin Immunol, 19(1):24～32.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol, 25(12):677～686.

Martinez FO, Helming L, Gordon S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu Rev Immunol, 27:451～483.

Munder M, Eichmann K, Morán JM, et al. 1999. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. J Immunol, 163(7):3771～3777.

Nathan C, Xie QW. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell, 78(6):915～918.

第二章　树突状细胞

1973 年，Steinman 和 Cohn 在小鼠脾脏中发现具有树枝状突起的独特形态的细胞，并将之命名为树突状细胞（dendritic cell，DC）。随着对不同组织来源 DC 研究的深入，目前已知的 DC 的亚群包括存在于淋巴组织、血液和非淋巴组织的经典 DC（conventional DC，cDC）及分泌Ⅰ型干扰素的浆细胞样 DC（plasmacytoid DC，pDC）。其中，经典 DC 的主要作用是诱导针对入侵抗原的特异性免疫应答并维持自身耐受，而浆细胞样 DC 的主要作用则是针对微生物，特别是病毒感染产生大量的Ⅰ型干扰素并激发相应的 T 细胞。

在本章中，我们主要介绍小鼠和人的 cDC 和 pDC 的分离培养方法和功能检测。在以下的内容中，除非特别说明，DC 均指经典 DC。

第一节　树突状细胞的分离

为了在体外研究 DC 的功能，我们有时需要对体内的 DC 细胞进行纯化。其纯化方法可以大致分为基于细胞物理性状的分离方法（如贴壁法）和基于细胞表面标记的分离方法（如 MACS 和 FACS 分离法）。

一、小鼠脾脏树突状细胞的分离

小鼠脾脏 DC 是研究得最多的淋巴组织 DC。其特征为组成性表达 MHC-Ⅱ类分子和 CD11c。该群细胞可进一步分为三群：主要分布于边缘区的 $CD4^+CD8^-CD11b^+$ DC，主要分布于 T 细胞区的 $CD4^-CD8^+CD11b^-$ DC 和双阴性 DC——$CD4^-CD8^-CD11b^+$。其中，$CD8^+$ DC 表达 CD1d 和 DEC-205。我们可以根据需要选择不同的方法将脾脏 DC 分选出来。

（一）贴壁法

小鼠脾脏 DC 在体外可黏附于玻璃或塑料表面，但培养 18～24h 后，其黏附能力丧失，借此可与巨噬细胞分离。该方法无需特殊试剂，不需要进行密度梯度离心，操作简便、省时。但用此种方法获取的 DC 数量少、纯度低，而且分离所得的 DC 处于不同的分化阶段，无法满足精细实验的需要。

材料与试剂

小鼠脾脏细胞悬液

氯化铵溶液 0.02mol/L Tris-Cl（pH7.2）/0.14mol/L NH_4Cl

RPMI-1640

PBS，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}，4℃

15ml 和 50ml 聚丙烯锥底离心管

离心机

100mm 细胞培养皿

倒置显微镜

步骤

1）制备小鼠脾脏细胞悬液，$Tris-NH_4Cl$ 裂解红细胞后，用含有 5%热灭活胎牛血清的 RPMI 1640 将脾脏细胞悬液调节细胞浓度至 1×10^7 个/ml。
2）将脾脏细胞悬液分装于 100mm 平皿内，于培养箱内培养，使树突状细胞和巨噬细胞黏附于培养皿表面。
3）1～3h 后弃去无黏附作用的淋巴细胞（主要是 T 细胞和 B 细胞），用 RPMI-1640 培养基清洗 2 次，弃尽液体，补充含有 10% 热灭活胎牛血清的 RPMI-1640。
4）于培养箱内继续培养 18～20h，收集脱壁的悬浮细胞即为富集的 DC。

（二）磁珠分选法

CD11c 表达于所有已知小鼠 DC 表面，所以将包被了磁珠的 CD11c 抗体与小鼠淋巴组织或非淋巴组织细胞悬液共孵育并置于磁场后，结合了 CD11c 抗体的细胞将留在分选柱中，脱离磁场后可分离得到 CD11c 阳性的 DC。该方法简单易行，若操作得当，细胞纯度可以达到 95%以上。但需购置相应分选设备及试剂，花费较高。

本方法以德国美天旎公司产品 CD11c 磁珠为例，介绍利用磁珠分选法纯化小鼠脾脏 DC。

材料与试剂

小鼠

解剖用品

CD11c 磁珠

含 2mmol/L EDTA 和 1%胎牛血清的预冷的 PBS

磁性分离装置

步骤

1）将小鼠脾脏通过胶原酶 D 消化或通过钢网研磨制备脾细胞悬液，将其通过 30μm 的尼龙网去除细胞团块后，得到单细胞悬液。
2）计数细胞，离心，弃尽上清后，每 10^8 个细胞加 400μl PBS。
3）每 10^8 个细胞加 100μl CD11c 磁珠。混匀后于 4℃孵育 15～20min。
4）用预冷的 PBS 离心洗涤 1 次，弃尽上清后，每 10^8 个细胞加 500μl PBS。
5）离心期间，将 MACS 分离磁铁安装到 MACS 多用支架上，并将 MS 分选柱放到磁体中，在分选柱下放一支无菌的离心管。用预冷的 MACS 缓冲液冲洗分选

柱 3 次，每次 0.5ml。弃洗脱液，在分选柱下方放置一支干净的无菌离心管。

6）将细胞悬液上样到分选柱上。

7）用 MACS 缓冲液冲洗分离柱，每次 0.5ml，洗 3 次。第一个 0.5ml 应缓慢加入以免扰动分选柱中的细胞。

8）从磁体上取下分选柱，放在一个干净的无菌 15ml 离心管上。在分离柱中加入 1ml 完全 RPMI-1640，将活塞塞进分离柱并洗脱阳性细胞。

注意事项

1）死细胞会非特异地结合磁珠，因此操作中要注意减少死细胞的产生。若死细胞过多，可以通过密度梯度离心或死细胞清除试剂盒来去除。

2）缓冲液中务必加入 EDTA 或类似物，维持细胞呈单细胞悬液状态，减少由于多个细胞粘连在一起而造成的非特异标记。

3）为获得高纯度的 DC，可以通过利用 Fc 受体阻断试剂（即 CD16/32 抗体）或小鼠免疫球蛋白来阻断 DC 表面的 Fc 受体，从而避免 Fc 受体介导的磁珠结合，提高 DC 的纯度。

4）与磁珠孵育最好在 4℃进行，温度过高或孵育时间过长会导致磁珠非特异黏附。

5）不同公司的磁珠抗体及分选柱有多种，需根据分选细胞种类和数量的不同加以选择。

（三）流式细胞仪分选

DC 表面表达多种相对特异性的表面标志，可根据实验需要，选用某些特定表面标志的单克隆荧光抗体作标记，明确目的细胞群，通过流式细胞仪做自动分选。

该方法可以根据多个标记进行细胞分选，弥补了 MACS 分选的不足，而且分离得到的 DC 细胞纯度更高。但是采用 FCM 分选目前存在的主要问题是 DC 的种类很多，发育的过程和表面特征性标志目前尚未完全清楚。因此，在做 DC 分离时，必须视标本来源及目的细胞选择合适的单克隆抗体（如 CD4、CD8、CD11c、33D1、DEC-205、CD80、CD86、CD40 和 MHC-Ⅱ类分子等）进行标记。另外，进行流式分选必须购置具有分选功能的流式细胞仪，价格昂贵，对操作人员的技术也有较高要求。

具体方法可参见流式细胞仪分选（第二十五章）。

二、人外周血树突状细胞的分离

（一）贴壁法

DC 具有轻度黏附特性。一般在经过分离液处理或培养后就自动从塑料平皿上脱落下来，而单核细胞和巨噬细胞可长时间黏附，借此可分离出 DC。这种方法无需特殊试剂，操作简便，但耗时很长，获取 DC 量少、纯度低，目前已很少使用。

材料与试剂

≤24h 内获得的白细胞

RPMI-1640

HBSS

FBS

14.5%的碘葡酰胺溶液，室温

PBS，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}，4℃

15ml 和 50ml 聚丙烯锥底离心管

9in（1in=2.54cm）（23cm）Pasteur 吸管

离心机

100mm 细胞培养皿

倒置显微镜

步骤

1）将新鲜无血凝块的肝素化血样置于 50ml 离心管中，加入等量 PBS。对于通过白细胞成分采集得到的白细胞，其血样与 PBS 以 1∶4 比例稀释，混匀。

2）用移液管吸取聚蔗糖-泛影葡胺溶液（每 10ml 血样/PBS 混合液加入 3ml 聚蔗糖-泛影葡胺溶液），伸入样品管底部，缓缓地将聚蔗糖-泛影葡胺溶液加入血样/PBS 混合液底部。18～20℃，GH-3.7 转头离心机 900*g* 持续离心 30min。注意启动时应缓慢加速。

3）吸弃含血浆和大部分血小板的最上层，小心地将下层的单个核细胞移入新的离心管。加入过量的 HBSS（达到细胞层 3 倍体积的量）洗细胞，18～20℃，400*g* 离心 10min，弃上清。重复洗涤细胞后，用完全 RPMI-1640 调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。

4）将单个核细胞悬液铺于 100mm 细胞培养皿中，每板 10ml（$\leqslant1\times10^8$）。37℃孵育过夜。

5）轻轻晃动培养皿，收集未贴壁细胞。沿皿壁向培养皿中加入预热的培养基，轻轻晃动培养皿，收取残留的未贴壁细胞。重复洗涤 3 遍。将所有的未贴壁细胞置于新的培养皿中孵育 30min 后，轻轻旋动培养板获取未贴壁细胞。若有需要可以重复一次。

6）室温 200*g* 离心，弃上清，用完全 RPMI-1640 重悬细胞。计数并调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。

7）室温下，在 15ml 锥底离心管中加入 4ml 14.5%的无菌碘葡酰胺溶液，将 8ml 细胞悬液缓慢加在碘葡酰胺溶液上，形成一明显界面。室温 800*g* 离心 10min。注意缓慢加速。

8）将无菌 Pasteur 吸管伸入培养基中，小心地收集液面交界处的细胞以及顶部约 1ml 的碘葡酰胺。

9）将细胞移入新的 50ml 锥底离心管，加入至少 2 倍体积的预冷 PBS，轻柔混匀。

10）450*g* 离心 10min。用完全 RPMI-1640 培养基洗涤细胞 2 次，台盼蓝拒染法计数活细胞，用完全 RPMI-1640 培养基重悬并调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。

11）再次将细胞悬液铺于 100mm 细胞培养皿上进一步去除单核细胞，每板 10ml 悬液。37℃孵育 1h。轻轻晃动培养板，收取悬浮细胞即为树突状细胞。

（二）MACS 法

根据人树突状细胞表面表达的相对特异性表面标志，将包被了磁珠的抗体与淋巴组织、血液或非淋巴组织细胞悬液共孵育并置于磁场后，结合了相应抗体的细胞将留在分选柱中，脱离磁场后可分离得到相应的 DC。不同组织来源的人源 DC 具有不同的特征。例如，CD141（BDCA-3）表达于人外周血中占很小一部分的 $CD11c^{dim}$ $CD123^-$ CD1c $(BDCA\text{-}1)^-$ $CD4^+$ 髓系 DC（约占所有外周血单个核细胞的 0.04%），而 CD1c（BDCA-1）则可用于分选在人外周血中占绝大部分的 $CD11c^{high}CD123^{low}$ 髓系 DC（约占所有外周血单个核细胞的 0.6%）。另外 DC-SIGN 则用于分离分布于皮肤、黏膜，以及淋巴组织包括扁桃体、淋巴结、脾脏等处的 DC。DC-SIGN 也表达于单核细胞来源的 DC，但不表达于外周血 DC 亚群。因此，可以根据实验需要选择合适的分选方式。这里介绍两步法分离外周血中成熟的 DC（其主要特征是高表达 CD83）。

材料与试剂

人抗凝外周血

包被磁珠的单抗，包括抗 CD3、CD14、CD19 和 CD56

CD83-PE

包被磁珠的抗 PE 抗体

预冷 PBS，含 2mmol/L EDTA 和 1%胎牛血清

磁性分离装置

15ml 聚丙烯锥底离心管

步骤

1）Ficoll 密度梯度法（或其他合适的方法）分离人外周血得到单个核细胞。台盼蓝计数活细胞，用预冷 PBS 调整细胞浓度为 2×10^7 个/ml，置于 15ml 锥底离心管中。

2）在细胞悬液中加入混合单抗的磁珠（抗 CD3、CD14、CD19 和 CD56），4℃，20min 后，离心洗涤 2 次，用预冷 PBS 调整细胞浓度至 2×10^7 个/ml，用磁性分离装置分离磁珠包被的细胞。

3）计数未结合的细胞，用完全 RPMI-1640 培养基重悬细胞至 2×10^7 个/ml。

4）将单个核细胞悬液铺于 100mm 细胞培养皿上，每个平皿 10ml。37℃孵育过夜后，收取未贴壁细胞，调整浓度至 1×10^7 个/ml。

5）加入适量抗 CD83 单抗，4℃孵育 30min，预冷 PBS 离心洗涤后，加入包被磁珠的抗 PE 抗体，4℃孵育 15min 后，预冷 PBS 离心洗涤后，调整细胞浓度至 2×10^7 个/ml。

6）磁性装置分离磁珠包被的细胞，用新鲜培养基重悬获得的细胞。

注意事项

同小鼠 DC 的 MACS 分选方法（第二章第一节）。

第二节 树突状细胞的培养

由于 DC 在体内数量极少，因此，从体内分离 DC 耗时而且细胞产量很低。从前体细胞诱导培养大量的 DC 并进行分析这一方法学的建立，对于研究体内 DC 的生物学功能具有重要的意义。

一、小鼠骨髓前体细胞培养树突状细胞

在小鼠的淋巴组织和非淋巴组织中，内源性 DC 的数量非常有限，仅占外周血的不足 1%。因而，在早期大大阻滞了对 DC 的研究。1992 年，Inaba 等利用小鼠骨髓中的前体细胞加外源性细胞因子组合来定向诱导培养树突状细胞获得成功，从而使体外研究树突状细胞的分化、发育及功能调控成为可能，也为对其进行遗传性状的修饰及用于体内免疫和治疗奠定了基础。不同实验室在应用该方法的过程中也进行了一定的改进。

小鼠骨髓中含有大量的造血干细胞，可通过 GM-CSF 和 IL-4 定向诱导 DC 的前体细胞向 DC 分化发育。由该方法可获得用于研究的足量的、分化发育状态基本一致的树突状细胞，这是目前最常用的小鼠树突状细胞的获得方法。需要注意的是，尽管天然存在的小鼠 DC 包括 $CD4^+$、$CD8^+$ 和 $CD4^-CD8^-$ 3 个亚群，但目前通过体外培养只能产生 $CD4^-CD8^-$ 这一亚群。

材料与试剂

6～7 周龄小鼠
冰点以及室温的 RPMI-1640 培养基
氯化铵溶液 0.02mol/L Tris-Cl，pH7.2/0.14mol/L NH_4Cl
小鼠 GM-CSF 和 IL-4
用于流式细胞仪检测 DC 的抗体
解剖用品
100mm 培养皿
6 孔培养皿（如 Falcon）
1ml 注射器
Nytex 滤器
15ml 和 50ml 聚丙烯锥底离心管

步骤

1）无菌取小鼠股骨和胫骨，置于 RPMI-1640 培养基中，用 1ml 注射器将骨骺端戳穿后，多次吸取 RPMI-1640 培养基，反复冲洗骨髓腔，直至骨头变白，以获得足够的骨髓细胞。
2）将获得的骨髓细胞通过筛网（去除颗粒）后收于离心管内，室温 280g 离心 5min，弃上清。
3）加入 3～10ml 的氯化铵裂解红细胞。室温静置 3min 后，室温 280g 离心 5min，

弃上清。

4）用 RPMI-1640 洗涤骨髓细胞 2 次，室温 280g 离心 10min。计数活细胞，用完全 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至 $1\times10^6\sim2\times10^6$ 个/ml 。

5）加入小鼠重组 GM-CSF 至终浓度为 10～20ng/ml，小鼠重组 IL-4 至终浓度 1ng/ml。将细胞悬液 4ml/孔接种于 6 孔板。

6）3d 后，可见板底长出集落。轻轻地摇动培养板，使未贴壁的细胞悬浮于液体中，倾斜培养板，移出培养基后，将 RPMI-1640 轻轻地沿孔壁加入孔中，轻轻摇动培养板后吸出洗涤液，最后每孔加入 4ml 含 10～20ng/ml rmGM-CSF 和 1ng/ml rmIL-4 的完全 RPMI-1640 培养基。

7）在第 5 天到第 8 天期间（此时已产生足够的聚集体），每 1～2d 半量换液一次（倾斜培养板，移出 2ml 培养基后，每孔沿孔壁加入 2ml 含 10～20ng/ml rmGM-CSF 和 1ng/ml rmIL-4 的完全 RPMI-1640 培养基）。

8）收集脱离的细胞，于室温 280g 离心 10min，弃上清。用含 10～20ng/ml rmGM-CSF 和 1ng/ml rmIL-4 的完全 RPMI-1640 培养基重悬，最高浓度为 1×10^6 个/ml。然后铺 100mm 培养皿，每个培养皿 10ml。

9）在细胞转移后 24～48h 内，每 24h 轻轻摇晃培养皿，收集非贴壁、非增殖、成熟的 DC，转移至另外的收集管中用于后期的研究。

10）若实验对 DC 的纯度要求较高，可采用 CD11c 磁珠分选的方法进行纯化（参见第一节相关内容）。

注意事项

1）选用的小鼠最好为雄性鼠，因为它们的骨头比较粗大；运输后需要休息至少 5d；不要使用应激或脱水的小鼠。

2）用于裂解红细胞的氯化铵的用量和作用时间根据经验决定。

3）收集 DC 的时间取决于实验需要。

二、人树突状细胞的培养

人源 DC 的培养主要是利用不同的细胞因子组合由外周血单核细胞或 $CD34^+$ 前体细胞进行定向诱导，目前因子组合有很多种，如 IL-4 联合 GM-CSF、IFNα 联合 GM-CSF、TNFα 联合 GM-CSF、IL-15 联合 GM-CSF、单独 TSLP（thymic stromal lymphopoietin，胸腺基质淋巴细胞生成素）进行诱导等，由此产生的 DC 的特性也各不相同。目前最常用的方法是 GM-CSF 和 IL-4 联合诱导外周血单核细胞和 TNFα 联合 GM-CSF 诱导 $CD34^+$ 前体细胞。

（一）从外周血分离单核细胞诱导生成树突状细胞

外周血单核细胞在 GM-CSF 和 IL-4 的作用下可以诱导分化成具有典型细胞学和功能特征的树突状细胞。该方法 DC 产出率高，可满足实验及临床需要，是目前应用最广泛的人的 DC 培养方法。但该方法相对繁琐，耗时较长。

材料与试剂

肝素抗凝血
PBS
聚蔗糖-泛影葡胺溶液（Ficoll-Hypaque）
FBS（Hyclone），加热灭活（56℃，1h）或者不加热均可
完全 RPMI-1640，室温和 37℃
磁珠包被的抗人 CD14 抗体
含 2mmol/L EDTA 和 1%胎牛血清的预冷的 PBS
14.5%的碘葡酰胺溶液，室温
重组人 GM-CSF
重组人 IL-4
重组人 TNF-α
倒置相差显微镜
磁性分离装置
移液管
15ml 或 50ml 聚丙烯锥底离心管
6 孔培养板
离心机

步骤

1）Ficoll 密度梯度法（或其他合适的方法）分离人外周血得到单个核细胞。台盼蓝计数活细胞，用完全 RPMI-1640 调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。
2）加入磁珠包被的抗人 CD14 抗体，4℃，20min 后，离心洗涤，用预冷 PBS 调节细胞浓度至 2×10^7 个/ml，用磁性分离装置分离磁珠包被的细胞。
3）洗脱阳性细胞，用含有 800U/ml 的 GM-CSF，500U/ml IL-4 的 RPMI-1640 调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml。将细胞悬液 4ml/孔接种于 6 孔板。
4）在培养的第 3 天，倾斜培养板，吸弃 50%的上清（注意不要触及细胞），加入等量含有 800U/ml 的 GM-CSF，500U/ml IL-4 的 RPMI-1640。
5）第 5 天，加入含有 100U/ml TNF-α、800U/ml GM-CSF、500U/ml IL-4 的 RPMI-1640 培养基。
6）到第 8 天或第 9 天用吸管吹吸，收取细胞用于后续研究。

注意事项

TNF-α 具有促进 DC 成熟的作用，可根据实验需要决定是否加入该因子，也可选用其他试剂，如 LPS 或抗 CD40 做促成熟之用。

（二）从脐带血获取 $CD34^+$ 细胞培养树突状细胞

DC 前体（$CD34^+$ 细胞）在体外保持进一步分化的潜能，在一定剂量的 GM-CSF 和 TNF-α 的联合作用下，$CD34^+$ 细胞可被定向诱导分化成树突状细胞。利用该方法培养

DC 会产生两种不同的亚群：$CD1a^{+}CD14^{+-}$ 的 LC 样 DC（Langerhans cell，郎罕氏细胞）和 $CD1a^{-}CD14^{+}$ 的髓系 DC。c-kit 配体能够增加培养体系中所有髓系 DC 的数量，而 TGF-β 可以促进 LC 样 DC 的发育。该方法受血样来源影响较大。在临床治疗过程中，也可通过给患者提前应用 G-CSF 增加外周血中 DC 前体的比例，从外周血中分离 $CD34^{+}$ 细胞，来培养 DC 用于治疗。

材料与试剂

脐带血
PBS
聚蔗糖-泛影葡胺溶液（Ficoll-Hypaque）
FBS
完全 RPMI-1640，室温和 37℃
预冷 PBS，含 2mmol/L EDTA 和 1%胎牛血清
磁珠包被的混合单抗（抗 CD3、CD14、CD19 和 CD56）
磁珠包被的抗人 CD34 抗体
重组人 GM-CSF
重组人 TNF-α
倒置相差显微镜
磁性分离装置
移液管
15ml 或 50ml 聚丙烯锥底离心管
6 孔培养板
离心机

步骤

1）Ficoll 密度梯度法（或其他合适的方法）分离人脐带血中的单个核细胞。台盼蓝计数活细胞，用预冷 PBS 调整细胞浓度为 1×10^{7} 个/ml。

2）在细胞悬液中加入磁珠包被的混合单抗（抗 CD3、CD14、CD19 和 CD56），4℃，20min 后，离心洗涤，用预冷 PBS 调节细胞浓度至 2×10^{7} 个/ml，用磁性分离装置分离磁珠包被的细胞。

3）收取阴性细胞，加入磁珠包被的抗人 CD34 抗体，4℃，20min 后，离心洗涤，用预冷 PBS 调节细胞浓度至 2×10^{7} 个/ml，用磁性分离装置分离磁珠包被的细胞。

4）洗脱阳性细胞，用含有 800U/ml 的 GM-CSF、100U/ml TNF-α 的 RPMI-1640 调整细胞浓度至 $1\times10^{5}\sim3\times10^{5}$ 个/ml。将细胞悬液 4ml/孔接种于 6 孔板。

5）在培养的第 3 天，倾斜培养板，吸弃 50%的上清（注意不要触及细胞），加入等量含有 800U/ml 的 GM-CSF、100U/ml TNF-α 的 RPMI-1640。

6）在后续的培养过程中，每 3d 半量换液，加新鲜的培养基和细胞因子。一般在 11～14d 即可收取细胞作为非成熟 DC 用于后续研究。若需要成熟 DC，可联合

应用 CD40L 和 TNF-α 或 LPS 等促进其成熟。

第三节 树突状细胞表型和功能检测

目前的研究表明，DC 在免疫应答的首要环节——抗原提呈中扮演着重要的角色，是目前公认的体内功能最强大的专职性抗原提呈细胞。在免疫稳定状态下，分布于外周非淋巴组织的 DC 处于非成熟状态，主要功能为识别和摄取抗原。与其功能相适应，非成熟 DC 表面表达低水平的 MHC-Ⅱ类分子和共刺激分子，高表达一系列受体以便于识别与病原体相关的物质，包括多种 Toll 样受体（Toll like receptor，TLR），C 型凝集素如甘露糖受体、DEC205 等。一旦发生感染或组织损伤，非成熟 DC 就会向炎性部位迁移，摄取加工抗原，同时释放大量的炎性因子，激发天然免疫应答，避免感染的扩散。同时，非成熟 DC 发生了一系列的变化，获得了成熟表型及功能：①丢失用于吞噬的受体；②高表达 MHC-Ⅱ 类分子和共刺激分子，包括 CD40、CD80 和 CD86；③形态发生改变；④启动抗原处理机制，包括溶酶体相关的膜蛋白（DC-LAMP）的水平增加。同时，成熟 DC 的趋化因子受体表达谱发生变化，CCR1、CCR5 和 CCR6 等的表达降低，而 CCR7 的表达会增高，从而促使 DC 从外周组织沿传入淋巴管迁移至邻近的次级淋巴组织，在那里，DC 与抗原特异性的初始 T 细胞相遇，诱导其活化并增殖成为效应 T 细胞，从而启动免疫应答。

由此可见，DC 在非成熟期和成熟期的表型和功能各不相同，通过对其进行检测，将为研究 DC 的分化发育及功能调控提供线索。

一、表型检测

由于缺乏树突状细胞特征性的表面标志，目前主要根据其表面分子表达谱，联合运用多种荧光素标记的单抗，通过流式细胞仪的方式来检测和鉴定树突状细胞。树突状细胞主要表达的分子有 CDllc、MHC-Ⅰ和 MHC-Ⅱ类抗原，共刺激分子如 CD80、CD86 和 CD40，黏附分子如 ICAM-1、VCAM-1，趋化因子受体如 CCR6、CCR7 和 CXCR4 等。并且随着树突状细胞的成熟，其 MHC 分子、共刺激分子和黏附分子表达明显增强，趋化因子受体表达谱发生重要变化。其中，CD83 的表达往往作为衡量人源 DC 成熟程度的一个重要指标。以上标志均可利用免疫荧光技术做 FACS 分析，来检测和鉴定树突状细胞及其成熟状态的变化。

材料与试剂

待测细胞悬液，浓度为 2×10^7 个/ml

阻断抗体 IgG 或 Fc 受体阻断试剂（即 CD16/32 抗体）

荧光素标记的目的单克隆抗体及相应对照抗体

PBS

2%（质量体积比）甲醛

流式检测专用试管

低瓦数白炽灯（如 40W 白炽灯）

Sorvall RT 6000B 离心机

步骤

1）准备 3 只 1.5ml 离心管，每管中加入 2×10^7 个/ml 细胞悬液 50μl，做好标记。

2）每管加入适量 IgG 或 Fc 受体阻断试剂（即 CD16/32 抗体），4℃孵育 10min。

3）在其中两管分别加入同一种荧光素标记的同型对照抗体和目的抗体，避光，4℃孵育 15min。

4）每管加入 1ml PBS，1500g 离心 3min。迅速倒掉上清后，用手指轻弹管底，使细胞沉淀变松。

5）每管加入 1ml PBS 后，移入流式检测专用试管中，4℃避光待检（可保存≤4h）。

6）用流式细胞仪进行检测并分析结果。

注意事项

1）死细胞会非特异地结合抗体，因此操作中要注意减少死细胞的产生。若死细胞过多，可通过利用 PI 或 7AAD 标记来排除死细胞的干扰。

2）若标记结束后无法直接检测，可以用 2%～4%多聚甲醛固定后置于 4℃，1 周内检测。

二、吞噬功能检测

树突状细胞在非成熟期具有较强的吞噬功能，而成熟 DC 的吞噬功能减弱，因而 DC 吞噬功能的变化通常可作为检测 DC 成熟程度的重要指标之一。

材料与试剂

待测细胞悬液，浓度 2×10^7 个/ml

荧光素标记的大分子蛋白质，如 BSA-FITC

预冷 PBS

台式离心机

流式细胞仪

步骤

1）准备 3 支 1.5ml 离心管，每管中加入 2×10^7 个/ml 细胞悬液 50μl，做好标记。

2）在其中两管分别加入荧光素标记的大分子蛋白质（如 BSA-FITC）200mg/ml，避光，将其中一管放入冰水混合物中，另外一管置于 37℃。孵育 3h。

3）每管加入 1ml 预冷 PBS，1500g 离心 3min。迅速倒掉上清后，手指轻弹管底，使细胞沉淀变松。

4）每管加入 1ml PBS 后，移入流式检测专用试管中，4℃避光待检（可保存≤4h）。

5）用流式细胞仪进行检测，分析各组的 FITC 平均荧光强度来反映其吞噬功能的强弱。

三、NO 检测

目前认为，某些亚群的树突状细胞在受到特定刺激后会产生大量的一氧化氮（NO），从而发挥负向免疫调节作用。NO 由一氧化氮合成酶催化 L-精氨酸与氧分子经多步氧化还原反应而生成。一氧化氮合成酶目前已知有 3 种异构体，分别为神经元型（neuronal NOS，nNOS）、内皮型（endothelial NOS，eNOS）及诱导型（inducible NOS，iNOS）。前两者为固有表达的酶，依赖于钙离子，正常状态下存在于神经组织及内皮细胞等细胞上。而诱导型一氧化氮合成酶的激活不依赖于钙离子，可被多种刺激因素如外来抗原、细胞因子或细菌内毒素所诱导。体内高出生理浓度的 NO 一般是 iNOS 被活化的结果。由于 NO 极不稳定，在水溶液中很快被氧化成 NO_2^- 和 NO_3^-，所以一般用测定 NO_2^-/NO_3^- 的浓度的方法反映 NO 的活性。通常用已知浓度的 $NaNO_2$ 溶液作为标准品计算浓度。

Griess 法测定 NO_2^-/NO_3^- 含量简便易行，无须特殊的设备，在一般实验室均可开展，因而是目前使用最普遍的方法。但总体来说，该法灵敏度不高，一般为 10^{-7}～10^{-8}mol/L 水平。目前有的实验室采用高效液相色谱法测定 NO_2^-/NO_3^-，可提高灵敏度，还能同时将 NO_2^- 和 NO_3^- 区分开来测定。另外，因灵敏度低，样品不宜做高倍稀释，故所需的样品量较大。

材料与试剂

树突状细胞培养上清

2mmol/L $NaNO_2$（Sigma），4℃保存

Griess 试剂

96 孔平底细胞培养板（Costar）

步骤

1）根据实验需要，树突状细胞经不同处理后培养 24～72h，取各组上清 100μl 分别加入 96 孔平底板中。

2）将 $NaNO_2$ 溶液倍比稀释（终浓度从 125μmol/L 至 1μmol/L）后，各取 100μl 加入 96 孔平底板中。

3）在待测孔和 $NaNO_2$ 标准孔中加入 100μl Griess 试剂。最好先加入萘乙二胺（naphthylenediamine），然后再加入氨基苯磺酰胺（sulfanilamide）。

4）用酶联仪检测 $NaNO_2$ 标准孔和各待测孔的光吸收值，测量波长为 550nm。用 $NaNO_2$ 标准孔的光吸收值和对应的浓度做一标准曲线（在 0～125μmol/L 范围内应呈线性相关）。用此标准曲线计算出各待测样品的 NO_2^- 值。结果以 NO_2^- 浓度值（μmol/L）或标准化换算后的 NO_2^- 摩尔值表示，即 10^5 个细胞或 1mg 蛋白质样品的 NO_2^- 摩尔数（nmol/10^5 个细胞或 nmol/mg 蛋白质）。

本方法检测 NO_2^- 灵敏度为 1μmol/L 左右。

注意事项

测定细胞培养介质中的 NO_2^-/NO_3^- 时，培养液成分中应不含酚红，因为酚红在酸

性环境中呈现的红色会干扰比色测定。培养液中污染的少量 NO_2^- /NO_3^- 可通过平行测定扣除背景。

四、细胞因子的检测

树突状细胞在活化后会分泌多种细胞因子和趋化因子，如 IL-1β、IL-6、TNFα、IL-12、IL-10、MIP-3β、RANTES 等，可利用 ELISA 试剂盒来检测细胞培养液上清中因子的含量或采用细胞因子细胞内标注的方法，利用流式细胞仪进行检测。

五、抗原提呈功能检测

树突状细胞最重要的特征就是具有刺激初始 T 细胞活化的功能，这种功能的鉴定主要是通过检测其抗原提呈来实现的。目前检测小鼠 DC 抗原提呈功能最常用的体系是抗原特异性 TCR 转基因小鼠来源的 T 细胞在该抗原存在的情况下与树突状细胞共孵育后检测其增殖情况。最常用的抗原特异性 TCR 转基因小鼠是 DO11.10 和 OT-Ⅰ、OT-Ⅱ小鼠。其中，DO11.10 小鼠为 Balb/c 背景，其 T 细胞携带 MHCII 类分子限制的、针对 $OVA_{323\text{-}339}$肽的转基因 TCR，这种 TCR 可以被抗体 KJ1-26 识别。而 OT-Ⅰ和 OT-Ⅱ小鼠为 C57 背景，其 T 细胞分别为 MHC-Ⅰ类和 MHC-Ⅱ类分子限制的，针对 $OVA_{257\text{-}264}$肽和 $OVA_{323\text{-}339}$肽的转基因 TCR，该 TCR 可以被抗 Vα2 或 Vβ5 抗体识别。利用此种 TCR 转基因小鼠来源的 T 细胞，可以检测 DC 通过 MHC-Ⅱ 类分子和 MHC-Ⅰ类分子提呈抗原的能力。现在以利用 DO11.10 小鼠来源的 T 细胞为例，介绍 DC 的抗原提呈功能的检测。

以往检测 T 细胞增殖更多采用 MTT 法或 ^{3}H-TDR 掺入法。但 MTT 法灵敏度低，^{3}H-TDR 掺入法因涉及同位素标记，容易造成同位素污染。该方法利用流式细胞仪进行检测，步骤简单、省时。

材料与试剂

DO11.10 小鼠
DC 细胞
OVA17 肽
包被磁珠的 CD4 抗体
CD4-FITC 或 KJ1-26-PE
7-AAD
预冷 PBS，含 2mmol/L EDTA 和 1%胎牛血清
完全 RPMI-1640 培养基
氯化铵溶液 0.02mol/L Tris-Cl，pH7.2 /0.14mol/L NH_4Cl
磁性分离装置
微量移液器
计数板
流式细胞仪
3μm 荧光标记的珠子（可选）

96 孔圆底板
15ml 离心管

步骤

1）常规取 DO11.10 小鼠脾脏制备脾脏细胞悬液后，用 NH_4Cl 溶液裂解红细胞，再用预冷 PBS 洗涤细胞，调整浓度为 2×10^8 个/ml。
2）加入包被磁珠的 CD4 抗体，4℃，20min 后，离心洗涤，用预冷 PBS 调节细胞浓度至 2×10^7 个/ml，用磁性分离装置分离磁珠包被的细胞。
3）洗脱阳性细胞，用完全 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml 后，加入 OVA17 肽至终浓度为 200～400nmol/L。
4）按 100μl/孔接种 96 孔圆底培养板。注意设立 T 细胞空白对照组。每组至少设立 3 个复孔。
5）取与 T 细胞相同背景小鼠来源的 DC 细胞，用完全 RPMI-1640 培养基离心洗涤后，用完全 RPMI-1640 培养基调整浓度，使 DC 与 T 细胞的浓度之比为 1∶5、1∶10、1∶20。
6）将不同浓度的 DC 按 100μl/孔加入已经接种了 T 细胞的 96 孔圆底板中。注意设立 DC 空白对照组。T 和 DC 的空白对照组加入等量完全 RPMI-1640 培养基。将培养板放入细胞培养箱中培养。
7）3～4d 后终止培养。小心地收集上清 150μl/孔，然后加入含有 CD4-FITC 或 KJ1-26-PE 和 7-AAD 的标记液，10μl/孔，4℃，15min 后，加入 PBS 至 200μl，移至流式上样管。
8）FACS 高速上样 52s。分析结果时，以 7-AAD 阴性、CD4 或 KJ1-26 阳性的细胞作为活细胞，计算活细胞相对数。
9）细胞培养上清可以用来检测 IL-2 和 IFN-γ 的浓度，反映 T 细胞的活化及增殖情况。

注意事项

此方法检测的是增殖后 T 细胞的组间相对数。为求得 T 细胞的绝对数量，可以在流式细胞仪上样之前，加入 1×10^5 个 3μm 荧光标记的珠子作为内参照，计数细胞后，利用公式：活细胞绝对数=(活细胞相对数/珠子相对数$\times10^5$)，计算 T 细胞绝对数。

六、混合淋巴细胞反应

反应性 T 细胞受到同种异体淋巴细胞表面异体组织相容抗原的刺激作用发生增殖反应。本方法常用于临床鉴定组织相容性。另外，利用^{3}H-TdR 掺入法检测 T 细胞增殖灵敏度高，但容易造成同位素污染，正逐渐被其他方法取代。

材料与试剂

反应细胞：来自脾、淋巴结、胸腺的淋巴细胞或纯化的 T 细胞和 T 细胞亚群
刺激细胞：同种异体小鼠脾细胞（H-2 或 MLS 位点不同）或人同种异体 PBMC，经照射或丝裂霉素 C 处理，或去除 T 细胞

96 孔圆底培养板

^{3}H 标记甲基胸腺嘧啶

100%乙醇

闪烁液

多孔收集器

玻璃纤维滤纸

β 液闪仪

液闪管

步骤

1）准备反应细胞：根据预计细胞浓度准备反应细胞，然后倍比稀释至每孔 0.5×10^5 个、1×10^5 个、2×10^5 个和 4×10^5 个细胞，每孔 100μl，各浓度设置 3 个复孔，每实验组应设立 3 个复孔（细胞浓度应预先滴定，若估计反应细胞较少，如胸腺细胞，则应选用较高的细胞浓度）。

2）准备刺激细胞：为避免刺激细胞中 T 细胞的增殖反应，可通过照射或丝裂霉素 C 处理而被抑制，或者去除 T 细胞。

丝裂霉素 C 处理：调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml。加入丝裂霉素 C，至终浓度 25μg/ml，37℃，5%CO_2 孵育 30min。完全培养基离心洗涤 3 次去除残余丝裂霉素 C（丝裂霉素 C 应避光保存，用时新鲜配制）。

照射：10～20Gy。

从刺激细胞中去除 T 细胞：因小鼠外周 T 细胞均表达细胞表面抗原 Thy-1，因此可利用抗 Thy-1 单克隆抗体加补体的方法去除 T 细胞。还可进一步利用 Percoll 密度梯度离心法富集 APC，或者利用 MACS 阴性分选去除 T 细胞。

3）每孔加入 100μl 经照射或丝裂霉素 C 处理或去除 T 细胞的刺激细胞（反应细胞与刺激细胞的比例应预先滴定）。单独反应细胞和单独刺激细胞作为阴性对照。

4）37℃，5%CO_2培养 5～7d，结束培养前 18h 每孔加入1μCi [^{3}H]胸腺嘧啶。

5）用半自动样品收集器收集样品，并用 β 液闪仪检测 cmp 值。

6）计算 Δcmp 值：用实验组（刺激组）3 个复孔的 cmp 平均值减去对照组（未加刺激剂组）3 个复孔的平均值，得出实验组的 Δcmp 值。

注意事项

反应时间依细胞类型和实验条件而定。

第四节　浆细胞样树突状细胞

1958 年，Lennert 和 Remmele 首次报道了分布于人淋巴结 T 细胞区的一种新型免疫细胞，其形态类似于浆细胞，但缺乏 B 细胞和浆细胞表面标志，后续研究发现这群细胞表达一些单核细胞和 T 细胞的标志，因而将这群细胞命名为浆细胞样 T 细胞或浆细胞样单核细胞。之后 O'Doherty 和 Grouard 分别从人外周血和扁桃体中分离出这类细

胞，发现 IL-3 和 CD40L 能够促使其分化为具有成熟树突状细胞形态的一类细胞，因而将它们命名为浆细胞样树突状细胞（plasmacytoid dendritic cell，pDC）。1999 年人们研究发现病毒感染能够刺激这群细胞快速分泌大量Ⅰ型干扰素，因此又被命名为Ⅰ型干扰素生成细胞（type Ⅰ interferon producing ceil，IPC）。刘永均小组进一步的研究证明了 IPC 在 IL3 和 CD40L 存在的条件下可分化为成熟的 DC 并诱导初始 T 细胞向 Th2 型分化。因此，将原先证明能诱导 T 细胞向 Th1 型分化的髓样树突状细胞（myeloid dendritic cell，mDC）命名为 DC1，而将 pDC 命名为 DC2。2000 年 Celia 等发现流感病毒和 CD40L 激活的 pDC 细胞可刺激诱导初始 T 细胞向 Th1 型分化。近几年的研究发现，不同活化状态的 pDC 还可诱导免疫耐受，以及调节性 T 细胞（regulatory T cell，Treg）的产生。除此以外，pDC 在 B 细胞向浆细胞分化、NK 细胞的激活、单核细胞向 DC 分化中也发挥了重要的作用。

一、浆细胞样树突状细胞的分离

（一）小鼠浆细胞样树突状细胞的分离

小鼠 pDC 缺乏特异性的表面标志，因此，其分离主要依赖于多个表面标志的组合来进行。目前普遍接受的小鼠 pDC 的表型特征为 $CD11b^- CD19^- CD3^- DX5^- B220^+ CD11c^+ Gr1^+ PDCA1^+$。可根据实验要求，选择磁珠分选或是流式分选来分离。在这里我们介绍利用两步磁珠分离法来分离小鼠 pDC。

材料与试剂

C57BL/6 小鼠脾脏

解剖器械

Tris-NH_4Cl（0.02mol/L Tris-Cl，pH7.2 /0.14mol/L NH_4Cl）

磁性分离装置

微量移液器

PE 标记的抗小鼠 CD11b、CD19、CD3、DX5 和 B220 荧光抗体

包被磁珠的抗 PE 抗体

预冷的 PBS，含 2mmol/L EDTA 和 1%胎牛血清

步骤

1）无菌条件下取正常 C57BL/6 小鼠脾脏，胶原酶消化或利用钢网研磨后得到单细胞悬液，加入 Tris-NH_4Cl 溶液裂解红细胞，预冷 PBS 离心洗涤。

2）用大鼠血清封闭后，加入适量 PE 标记的抗小鼠 CD11b、CD19、CD3 和 DX5 混合荧光抗体，混匀，4℃，30min 后用预冷 PBS 离心洗涤。

3）加入抗 PE 的细胞分选磁珠（100μl /10^7 个细胞），4℃，15min 后用预冷 PBS 离心洗涤。调整细胞浓度至 2×10^8 个。

4）用磁性分离装置分离细胞，收取阴性细胞。

5）所得 $CD11b^- CD19^- CD3^- DX5^-$ 细胞悬液用预冷 PBS 离心洗涤后加入 PE 标记的抗小鼠 B220 荧光抗体，4℃孵育 30min。

6）预冷 PBS 洗涤 2 次后加入抗 PE 的细胞分选磁珠，4℃孵育 15min，预冷 PBS 洗涤。调整细胞浓度至 2×10^8 个/ml。

7）用磁性分离装置分离细胞，收取阳性细胞，用含有 100ng/ml rmFLT3L 的完全 RPMI-1640 培养基进行培养。

8）检测分选 pDC 的纯度。

（二）人源 pDC 的分离

目前从人外周血和扁桃体分离 pDC 主要有 3 种方法：①三色免疫荧光标记流式分选 $CD4^+CD11c^-Lin^-$（CD3、CD14、CD16、CD19、CD56）细胞；②三色免疫荧光标记流式分选 $CD123^{high}HLA\text{-}DR^+Lin^-$ 细胞；③免疫荧光标记流式分选或利用磁珠分离 $BDCA2^+$ 或 $BDCA4^+$ 细胞。其中，第二种方法可能会产生嗜碱性粒细胞的污染。在第三种方法中，尽管 BDCA2 相对于 pDC 具有特异性，但抗 BDCA2 抗体可能抑制 pDC 分泌 IFN-α。很多实验室目前主要应用抗 BDCA4 磁珠分离试剂盒，由于 BDCA4 也表达于一小部分 $CD11c^+$ 髓系 DC 和 T 细胞，因此也不能分离出纯的 pDC。因此，若需要纯度相对较高且功能不受影响的 pDC，推荐使用第一种方法。若对纯度要求非常高，可结合 3 种方法，先通过磁珠分离 $BDCA4^+$ 细胞，然后根据其表型特征，即 $CD4^+$ $CD123^+CD11c^-CD3^-CD14^-CD15^-$ $CD16^-$ $CD19^-$ 及 $CD56^-$ 进行流式分选。具体方法可借鉴前述。

二、浆细胞样树突状细胞的培养

研究表明体内存在着两条不同的 pDC 前体分化途径，即胸腺内途径和胸腺外途径。pDC 细胞前体在 IL-3 的刺激下可以分化为未成熟 pDC，在 IL-3 和 CD40L 的共同刺激下则分化为成熟 pDC。此外，pDC 前体细胞也在病毒刺激下产生大量的Ⅰ型干扰素并分化成熟。在这里，我们介绍从小鼠骨髓前体细胞和人外周血 $CD34^+$ 细胞培养 pDC。

（一）小鼠骨髓前体细胞培养浆细胞样树突状细胞

小鼠骨髓中含有大量的造血干细胞，可通过 Flt3L 定向诱导 $CD11c^+CD11b^-B220^+$ $Gr\text{-}1^+$ pDC 前体的产生。

材料与试剂

6～7 周龄小鼠
冰点以及室温的 RPMI-1640 培养基
氯化铵溶液 0.02mol/L Tris-Cl，pH7.2 /0.14mol/L NH_4Cl
小鼠重组 Flt3L
用于流式细胞仪检测 pDC 的抗体：CD11c、CD11b、B220、Gr-1
解剖用品
100mm 培养皿
6 孔培养皿（如 Falcon）

1ml 注射器

15ml 和 50ml 聚丙烯锥底离心管

步骤

1）无菌条件下取小鼠股骨和胫骨，置于 RPMI-1640 培养基中，用 1ml 注射器将骨骺端戳穿后，多次吸取 RPMI-1640 培养基，反复冲洗骨髓腔，直至骨头变白，以获得足够骨髓细胞。

2）将获得的骨髓细胞通过筛网（去除颗粒）后收于离心管里，室温下 280g 离心 5min，弃上清。

3）加入 3～10ml 氯化铵裂解红细胞。室温静置 3min 后，室温下 280g 离心 5min，弃上清。

4）用 RPMI-1640 洗涤骨髓细胞 2 次，室温下 280g 离心 10min。计数活细胞，用完全 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至 1×10^6～2×10^6 个/ml 。

5）加入小鼠重组 Flt3L 至终浓度为 100ng/ml，将细胞悬液 4ml/孔接种于 6 孔板。

6）第 5 天，半量换液，补充 Flt3L。

7）培养至第 10 天，收集细胞，大鼠血清封闭后，标记 CD11c、CD11b 和 B220，于流式细胞分选仪上分选 $CD11c^+$ $CD11b^-$ $B220^+$ 细胞，得到 FLT3L 诱导的骨髓来源 pDC，用于后续实验。

（二）从人外周血获取 $CD34^+$ 细胞培养浆细胞样树突状细胞

DC 前体（$CD34^+$ 细胞）在体外保持进一步分化的潜能，在一定剂量的 FLT3-L 的作用下，$CD34^+$ 细胞可被定向诱导分化成浆细胞样树突状细胞。

材料与试剂

人外周血 $CD34^+$ 细胞

完全 RPMI-1640，室温和 37℃

相差显微镜

移液管

15ml 或 50ml 聚丙烯锥底离心管

6 孔培养板

离心机

步骤

1）常规分离人外周血 $CD34^+$ 细胞。用含有 100ng/ml 的 Flt3L 的完全 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至 1×10^5～3×10^5 个/ml。将细胞悬液 4ml/孔接种于 6 孔板。

2）第 5 天，半量换液，补充 Flt3L。

3）培养至第 10 天，收集细胞，用 FITC 结合的谱系抗原 CD3、CD14、CD16、CD19、CD20 和 CD56，APC 结合的 CD11c 和 PE 结合的 CD123 标记细胞，利用流式细胞仪分选 Lin^- $CD11c^-$ $CD123^{high}$ 的 pDC。

4）为进一步活化分选得到的 pDC，1×10^5 个细胞与 300pfu/细胞的单纯疱疹病毒 HSV-1 共培养 48h。

5）为促进分选得到的 pDC 的成熟，细胞可在 25ng/ml IL-3 存在的条件下与固化的 CD40L 共培养 3d，或者用 3μg/ml CpG 刺激 3d。

三、浆细胞样树突状细胞表型及功能检测

（一）表型检测

pDC 同 cDC 类似，缺乏特异性的表面标志，表达抗原提呈所必需的 MHC-Ⅰ类和 MHC-Ⅱ类分子，协同刺激分子如 CD40、CD80 和 CD86 等，并随着细胞的成熟上调其表达，只是其变化程度不及 cDC。

人源 pDC/IPC 不表达的谱系特异性表面标志包括 CD19、TCR 和 CD3 复合体及 CD14、CD16、CD56 和 CD11c。不表达髓系标志，如 CD11b、CD13、CD14 或 CD33，但表达淋巴系标志，如 Pre-Tα、Igl-like 14.1 和 Spi-B，相对特异性地表达 BDCA-2 和 BDCA-4。其他还表达 CD4、TLR7 和 TLR9 以及 IL-3R 等，CD83 的表达往往作为衡量其成熟程度的一个重要指标。

小鼠 pDC 的表面标志特征为 $CD11c^+B220^+Gr\text{-}1^+CD45Rb^{high}CD11b^-$，与人源 pDC 不同的是，小鼠 pDC 表达 CD11c 而不表达 CD123（IL-3R α 链），还表达 PDCA1 和 siglec-H。其中，siglec-H 被认为是小鼠 pDC 相对特异性的表面标记。

具体的检测方法同 cDC。

（二）吞噬功能检测

与 cDC 不同，pDC 在整个成熟过程中都不具有吞噬功能，这可以作为 pDC 的鉴别特征之一。

（三）细胞因子分泌检测

pDC 最大的特征是病毒感染能够刺激这群细胞快速分泌大量Ⅰ型干扰素。可利用 ELISA 试剂盒来检测细胞培养上清中因子的含量或进行胞内标记，利用流式细胞仪进行检测。

第五节　其他树突状细胞亚群

调节性 DC（regulatory DC）是根据 DC 的功能特点进行命名的一个 DC 亚群。最初对于 DC 的认识主要集中在激发正向免疫应答、清除病原微生物方面，而近年来的研究则表明 DC 在负向调控免疫应答、维持免疫耐受等方面也发挥着关键作用。越来越多的研究证明有很多的 DC 亚群具有抑制 T 细胞增殖的功能，因而将这些细胞称为“调节性 DC”。

到目前为止，已报道的多种调节性 DC 的来源、表型和发挥调节功能的机制各不相同。最常用的制备调节性 DC 的方法是利用调节性细胞因子，如 TGF-β 或 IL-10 来培养

DC前体，产生的各种调节性DC的CD11c、MHC分子及共刺激分子的表达水平各不相同。其调节性作用的发挥，主要通过3种机制来实现：缺失共刺激信号，通过Fas/FasL系统或色氨酸代谢产物来清除抗原反应性T细胞，以及诱导Treg细胞产生。这种制备调节性DC的方法比较简单，很难反映体内的真实情况。考虑到调节性DC的产生离不开免疫器官的基质微环境，本实验室制备了小鼠的脾脏基质细胞（$CD11b^-CD106^+$）来模拟基质微环境，通过将成熟DC与脾脏基质细胞共培养，发现成熟DC可以发生增殖而且其功能发生转变，具有负向调节作用，将其称为diff DC。在这里我们主要介绍利用该方法制备调节性DC。

材料与试剂

小鼠
解剖器械
CD11b磁珠
抗CD106-PE
抗PE磁珠
磁性分离装置
FBS
RPMI-1640
5mmol/L EDTA的0.1%胰酶
成熟DC
6孔板和24孔板

步骤

1）无菌分离1周的C57BL/6小鼠脾脏，用无菌剪刀剪至1～2mm大小，将组织块均匀分布于24孔培养板底，使其牢固黏附，加少许含20%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基，液体的量以使组织块不脱落为宜。
2）次日补含20%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基，1ml/孔。
3）2～3周后，将板底贴壁黏附的细胞用含5mmol/L EDTA的0.1%胰酶消化，传代。
4）待贴壁黏附的细胞扩增至一定量以后，先用抗CD11b磁珠标记，磁性分离装置分选后，收取阴性细胞，再用抗CD106-PE标记，然后用抗PE的磁珠标记，磁性分离装置分选后，收取阳性细胞于含20%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基中继续培养，每周传代一次，作为内皮型脾脏基质细胞。
5）当内皮型脾脏基质细胞达到50%～60%融合时，用含5% FBS的RPMI-1640培养基重悬成熟DC接种于基质细胞中，细胞浓度为2×10^6个/5ml/孔（6孔板）。在共培养至少7d后采用2mmol/L EDTA消化并吹下细胞，用CD11c磁珠阳性选择，即为富集的调节性树突状细胞diff DC。

（郭振红　曹雪涛）

参考文献

科利根 JE，比勒 BE，马古利斯 DH，等. 2009. 精编免疫学实验指南. 曹雪涛，于益芝，孙卫民，等译. 北京：科学出版社.

Ardavín C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. Nat Rev Immunol, 3(7):582～590.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. 1997. $CD34^+$ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocytemacrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor α: Ⅱ. Functional analysis. Blood, 90(4):1458～1470.

Liu Y. 2005. IPC: Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. Annu Rev Immunol, 23:275～306.

Zhang M, Tang H, Guo Z, et al. 2004. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. Nat Immunol, 5(11):1124～1133.

第三章 NK与NKT细胞

第一节 概 述

NK细胞（natural killer cell）是一群大颗粒淋巴细胞（large granular lymphocyte，LGL），它们不需要抗原激活，以MHC非限制性的方式杀伤肿瘤细胞。成熟的NK细胞离开骨髓进入外周免疫器官，主要分布在脾脏、肝脏和外周血中。NK细胞是固有免疫的第一道防线，在免疫监视中具有重要作用，又是获得性免疫调节的关键细胞，另外还参与造血的调节等过程。检测NK细胞的分化阶段、NK细胞表面功能受体表达、NK细胞的细胞因子产生与分泌，以及NK细胞的杀伤功能可以帮助更好地了解NK细胞的功能状态，及其在病理和生理状况下的重要性及其机制。

在淋巴细胞群中，人的NK细胞为$CD56^+CD16^+CD3^-TCR^-BCR^-$，而小鼠的NK细胞为$NK1.1^+DX5^+CD3^-TCR^-BCR^-$，其中，CD56、CD16和NK1.1、CD49b（DX5为抗CD49b抗体克隆）为NK细胞的特异性标记。值得注意的是，在小鼠中，NK1.1分子表达于C57BL/6、C57BL/10或H2b、H2d、H2q同系小鼠，BALB/c小鼠不表达NK1.1，而CD49b（DX5）则为泛NK标志。某些NK细胞表达有T细胞相关的分子，如CD2（80%～90%）、CD8（α/α，30%）、CD3ξ（20%～30%），但是并不具有T细胞特异性标志CD3和TCR。细胞因子IL-2、IL-12、IL-18、IFN-γ等都可以明显地激活NK细胞。人的NK细胞可以根据表达CD56抗原多少分成两个亚群（即$CD56^{bright}$、$CD56^{dim}$）。其中，$CD56^{bright}$亚群约占NK细胞的10%，能够产生一系列细胞因子（如IFN-γ、TNF-α、TNF-β、GM-CSF和IL-10），发挥免疫调节作用；$CD56^{dim}$细胞亚群约占NK细胞的90%，很少产生上述细胞因子，主要发挥细胞毒效应。在进行NK相关的实验时，经常需要根据NK细胞的特异性标记来分离和纯化NK细胞。

NK细胞可以通过分泌细胞因子调节免疫，通过释放颗粒酶、穿孔素等直接杀伤靶细胞，或者通过其表面表达的FasL、TRAIL等分子诱导靶细胞凋亡。通常，可以通过检测上述因素来了解NK细胞的功能活性。另外，NK细胞的活性还受到其表面受体的调控，活化性受体和抑制性受体的表达及其刺激信号的平衡决定着NK细胞的功能方向，即活化还是保持静止状态。所以，检测NK细胞表面相关功能受体的表达情况，也可以反映NK细胞的功能活性。

正常人外周血分离得到的NK细胞，虽然具备直接杀伤靶细胞的功能，但仍有局限性，只能对NK细胞敏感的靶细胞产生杀伤作用，如果将NK细胞在体外经IL-2培养4～7d后，这些细胞便拥有了广谱的杀伤肿瘤细胞的效应，能够杀伤NK不敏感肿瘤细胞，这些细胞被称为LAK细胞（lymphokine-activated killer cell）。但是在临床应用中，

LAK 细胞的前体不仅包含 NK 细胞，还含有 T 细胞。

本章主要就 NK 细胞的分离、NK 细胞的功能检测，以及小鼠体内删除 NK 细胞的原理与方法做一介绍。

第二节　NK 细胞的分离

一、各种 NK 细胞分离方法的比较

早期，NK 细胞根据其形态学定义为大颗粒淋巴细胞，NK 细胞分离方法也是根据 NK 细胞与其他细胞的密度差异来进行的，如利用 Percoll 连续密度梯度或者不连续密度梯度来进行分离。这种方法仅能够用于分离人和大鼠的 NK 细胞，而在小鼠，NK 细胞的异质性远远大于人和大鼠，利用这种密度梯度方法分离 NK 细胞就极为不精确。此外，具有大颗粒细胞特点与活性的细胞也包括某些 T 细胞。所以此法现在已经很少使用，逐渐被其他更为精确的方法取代。

用特异性的单克隆抗体包被，然后用补体溶解抗体包被的细胞来除去非 NK 细胞的方法，能够得到较高纯度的 NK 细胞，而且 NK 细胞无抗体结合，不会受到实验因素之外的无关刺激，能够使纯化得到的 NK 细胞保持原始状态。只是这种方法需要多种单克隆抗体，实验前要进行预实验以确定抗体、补体的效价和最佳用量。此方法曾得到过广泛的应用，不过，现在逐渐被免疫磁珠的阴性分选法所取代。

免疫磁珠分离分为阳性分离法和阴性分离法，可以特异快速地纯化细胞，得到的细胞纯度高。免疫磁珠的阳性分离法，是以结合了磁珠的 NK 细胞的特异性标志抗体（如人的 CD16、小鼠的 DX5 抗体）来纯化 NK 细胞，阳性磁珠分离与流式阳性分选具有类似的缺点，即特异表型的抗体可能对目标细胞造成刺激，影响实验结果。阴性分选则克服了这一缺点，用非 NK 细胞的各种细胞标志性分子抗体结合的磁珠来标记细胞，通过磁柱将这些细胞除去，得到纯的 NK 细胞，免疫磁珠阴性分离法是目前较为理想的纯化 NK 细胞的方法。

FACS 流式分选法可以非常特异地得到 $CD16^+$ 人 NK 细胞或者 $CD3^-$ $NK1.1^+$ 小鼠 NK 细胞，纯度高，但是因为：①流式分选的速度较慢，NK 细胞的含量又低（占人血淋巴细胞的 5%～15%，小鼠脾脏细胞小于 2.5%），要得到实验数量的 NK 细胞所需的时间较长；②实验需要昂贵的分选专用设备，分选花费大；③利用特异表型的抗体标记细胞后，抗体的结合有可能会对细胞造成非实验因素的刺激，影响实验结果，如 NK1.1 抗体结合后，有报道（Karlhofer et al.，1991）可以刺激 NK 细胞的杀伤和细胞因子分泌。当然流式分选也可以用于阴性分选细胞，即用非 NK 细胞的标志性分子抗体染色细胞（如 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、红细胞等），流式分析后，收集淋巴细胞群落内所有抗体染色阴性的细胞，去除抗体染色阳性细胞、死细胞等。流式阴性分选可以避免由于抗体的结合对细胞产生的刺激，但是需要多种荧光标记的抗体，实验成本较大，相比之下，利用免疫磁珠进行阴性分选得到纯化的 NK 细胞更为经济，但流式分选可以得到更高纯度的 NK 细胞。

当然，实验中可以将几种方法联合应用。例如，当需要得到高纯度的大量人 NK 细胞时，可以先用 Percoll 分离法或者磁珠分离法粗略地纯化 NK 细胞，再用流式分选法分选得到高纯度的细胞，以节省细胞分离的时间。

二、人的 NK 细胞的分离

人的 NK 细胞一般从外周血中分离纯化。取人外周抗凝血或者浓缩白细胞 50ml，用 Ficoll-Hypaque 密度梯度法离心分离出人 PBMC（参见第一章第二节），以 HBSS 洗涤后，用适量 PBS（含 2mmol/L EDTA）重悬细胞，备用。在所得到的 PBMC 用于 NK 细胞分离时，要注意以下几点。

1）人血制品可能有感染性，要小心操作，加强实验防护；

2）以 Ficoll-Hypaque 密度梯度法离心得到 PBMC 后，洗涤时，如果在离心后上清仍然混浊，可以用 HBSS 多洗 1 或 2 次，直至离心后上清清澈，以去除其中的血小板。PBMC 中所含的大量血小板将对 NK 细胞分离产生如下不良影响：因为血小板具有贴壁特性，将影响淘洗法中贴壁去除单核细胞的效果；血小板为 CD49b（DX5）阳性，如果用抗体 DX5 标记细胞，进行磁珠阳性分选或流式阳性分选将得到大量的血小板；血小板能够黏附磁柱，占据结合位置，使免疫磁珠法中标记阳性的细胞不能结合磁珠而丢失；在流式分选中，将因为血小板数目巨大而影响 NK 细胞分选的纯度和得率。

（一）人 NK 细胞的 Percoll 分离法

Percoll 是一种包有乙烯吡咯烷酮的硅胶颗粒。渗透压很低（＜20mOsm/kg H_2O），黏度很小，扩散常数低，所形成的梯度十分稳定。另外，Percoll 不穿透生物膜，对细胞无毒，因而被广泛应用于分离细胞、亚细胞成分、细菌及病毒，还可将受损细胞及其碎片与完好的活细胞分离。采用预先铺制的密度梯度在低离心力（200～500g）下离心数分钟至数十分钟即可达到满意的分离结果。此法可用于分离人和大鼠的 NK 细胞，分离的 NK 细胞 60%～80%是大颗粒淋巴细胞。由于小鼠的 NK 细胞异质性较大，经 FACS 测定，Percoll 分离法得到的小鼠 NK 细胞中，$CD3^-$ $NK1.1^+$ 细胞只能占到 40%左右，所以本法不能用于小鼠。此方法是一种较为粗略的分离 NK 细胞的方法，可以用于纯化 NK 细胞的第一步粗略分离，再利用其他方法（如流式分选）高度纯化 NK 细胞，以达到缩短分离时间、减少试剂用量的目的。

材料与试剂

人外周抗凝血或者浓缩白细胞

RPMI-2、RPMI-10 NK 细胞完全培养基（RPMI-1640 含 2%或 10% FBS，2mmol/L L-谷氨酰胺，25mmol/L HEPES 缓冲液，50μg/ml 硫酸链霉素，500ng/ml 两性霉素 B，100U/ml 青霉素）

Ficoll-Hypaque 密度梯度分液

Percoll 原液，用 8.5%和 0.85%的 NaCl 溶液配制成等渗的 45%和 40%的 Percoll

工作液

荧光标记的抗CD3、抗CD56、抗CD16抗体

HBSS

步骤

1）取人外周抗凝血或者浓缩白细胞50ml，用Ficoll-Hypaque密度梯度法离心分离出人PBMC，以15ml PBS（含2mmol/L EDTA）重悬细胞。

2）配制40%和45%的等渗Percoll各15ml，在50ml离心管中注入45% Percoll，其上依次小心铺入40% Percoll、15ml PBMC悬液，500g离心30min。

3）吸取40%与45% Percoll界面的细胞层，用HBSS 300g，10min洗涤2次，HBSS重悬，4℃备用。

4）以荧光标记的抗CD3、抗CD56和抗CD16抗体标记细胞，流式检测细胞纯度。

（二）人NK细胞的淘洗分离法

新鲜外周血为人NK细胞的主要来源，经Ficoll-Hypaque密度梯度离心分离后，所获得的细胞中有血小板、单核细胞、B细胞、T细胞等，用各种细胞的相应特征可以去除这些细胞，得到无T细胞和B细胞表面标志的裸细胞，主要由NK细胞和LAK的前体细胞组成。本法经济，分离得到的细胞活力好，细胞未受到活化刺激，但是操作复杂、费时，如果其中某一步骤操作失误即可导致细胞纯化失败。最后得到的裸细胞，要流式测定NK细胞含量，以保证实验的成功。

材料与试剂

人外周抗凝血或者浓缩白细胞

Ficoll-Hypaque密度梯度分离液

HBSS

去除单核细胞、B细胞、T细胞的材料与试剂分别参见第一章、第四章和第五章

步骤

1）制备PBMC悬液，用HBSS洗涤2或3次，去掉血小板。

2）黏附法去除单核细胞，过尼龙毛柱去除B细胞，E花环形成法去除T细胞。

3）收集剩下的裸细胞，HBSS洗涤后重悬备用。

（三）磁珠阳性分离人NK细胞

人的NK细胞为$CD56^{+/-}CD16^{+}$的淋巴细胞，利用抗CD16抗体将NK细胞和磁珠相连接，通过磁柱时，在外加磁场力作用下，与带有磁珠的抗体结合的细胞被吸附而停滞于磁场中，无CD16表面抗原分子的细胞由于不能结合特异性抗体，无磁珠与之结合，不在磁场中停留，在细胞过磁柱后能够被轻易洗脱，在脱离磁场后，$CD16^{+}$的NK细胞可以轻易地洗脱下来，从而能够得到纯化的$CD16^{+}$ NK细胞。磁珠阳性分离法分离人NK细胞，快速、经济、纯度高、细胞活性好，缺点是由于有抗CD16抗体结合了NK细胞，对NK细胞造成刺激，可能影响功能实验的准确性。另外，此种方法纯化得

到的细胞含有少量的 NKT 细胞。实验时应引起注意。

材料与试剂

人外周抗凝血或者浓缩白细胞

Ficoll-Hypaque 密度梯度分离液

PBS（含 2mmol/L EDTA 或含 1%人血清，2mmol/L EDTA）

抗 CD16 抗体

羊抗小鼠 IgG 包被的磁珠

MS 柱或者 LS 柱

磁铁架

步骤

1）取人外周抗凝血或者浓缩白细胞（分离血小板的剩余细胞）50ml，用 Ficoll-Hypaque 密度梯度法离心分离出人 PBMC。

2）用 15ml PBS（含 2mmol/L EDTA）以 300*g* 离心 5min，洗涤细胞 2 次，以 PBS（含 1%人血清，2mmol/L EDTA）悬浮细胞至 10^8 个/ml，置于 1.5ml 离心管中 4℃备用。

3）将抗 CD16 抗体加入细胞中（终浓度为 10μg/ml），4℃或者冰浴 30min。

4）用冷 PBS（含 2mmol/L EDTA）以 700*g*，30s 洗涤细胞 2 次，用 0.8ml PBS（含 1%人血清、2mmol/L EDTA）重悬 10^8 个细胞，加入 0.2ml 羊抗小鼠 IgG 包被的磁珠，4℃孵育 30min，并每 5min 振荡一次。

5）用 PBS（含 2mmol/L EDTA）以 700*g*，30s 洗涤细胞 2 次，以 1ml PBS（含 1%人血清、2mmol/L EDTA）重悬细胞，室温备用。

6）MS 柱或者 LS 柱安装于磁铁架上，用 1ml PBS（含 1%人血清、2mmol/L EDTA）预洗柱子 3 次，然后将上述细胞悬液加入柱子中，收集流出液，再加入柱子中，以 1ml PBS（含 2mmol/L EDTA）洗涤柱子 10 次。

7）取下分离柱以脱离磁场，用 3ml PBS（含 1%人血清、2mmol/L EDTA）冲洗下磁珠结合的细胞，反复 3 次，300*g* 离心 5min，以适量的 HBSS 重悬细胞，置于 4℃备用。

8）细胞计数，并以流式细胞仪分析磁珠分离的效果。

注意事项

1）在标记抗体之前，可以先用 Percoll 分离法或者淘洗法预先分离 NK 细胞，再用此法进一步纯化，能够达到减少试剂用量、提高纯度的目的。

2）如果磁珠分离后还要流式测定分离的效果，上述步骤 3）中所用的抗 CD16 抗体要为带荧光素的抗体，否则，因为 NK 细胞表面的 CD16 分子已经在磁珠分离时被抗体占据，纯化后，再用带荧光的 CD16 抗体染色 NK 细胞将难以成功。

（四）磁珠阴性分离人 NK 细胞

人的 NK 细胞的表型特征为 $CD56^{+/-}CD16^{+}CD3^{-}CD19^{-}CD14^{-}CD5^{-}$，因此，用

磁珠分离的方法去掉PBMC中的T细胞（$CD3^+$）、B细胞（$CD19^+$）、单核细胞（$CD14^+$）和红细胞，收集未黏附磁珠而被洗脱的细胞，即能够分离得到纯度较高的NK细胞。

材料与试剂

人外周抗凝血或浓缩白细胞

Ficoll-Hypaque密度梯度分离液

PBS（含2mmol/L EDTA和1%人血清，或只含2mmol/L EDTA）

抗CD3抗体、抗CD5抗体、抗CD19抗体、抗CD14抗体、抗人红细胞抗体

羊抗小鼠IgG包被的磁珠

MS柱或LS柱

磁铁架

步骤

将以上磁珠阳性分离人NK细胞的方法中的步骤3）加入的抗体换作抗CD3抗体、抗CD5抗体、抗CD19抗体、抗CD14抗体、抗人红细胞抗体的混合液。其他步骤与磁珠阳性分离人NK细胞的方法相同。过磁柱后，丢弃磁柱黏附的细胞，收集流脱的细胞即为NK细胞。

注意事项

1）用于阴性分离的抗体特异性及最佳抗体浓度较为重要，需要在实验前预实验确定。

2）抗体的Fc段能够与NK细胞表面的FcR非特异结合，因此，阴性分离时最好用抗体的Fab段，只是价格较贵。

3）其他注意事项与磁珠阳性分离人NK细胞的方法相同。

（五）流式分选法纯化人NK细胞

NK细胞表达众多表面分子，但只具有相对特异性。通常将$CD56^+CD16^+CD3^-TCR^-BCR^-$的淋巴样细胞定为NK细胞，并依CD56的表达密度不同，将NK分为$CD56^{bright}$和$CD56^{dim}$两群，利用荧光标记的抗CD3、抗CD16抗体标记细胞，用流式分选的方法可以得到高度纯化的NK细胞。当然也可以同时用荧光标记的CD56抗体染色细胞，流式分选$CD56^{bright}$和$CD56^{dim}$的NK细胞亚群分别进行研究。

材料与试剂

人外周抗凝血或者浓缩白细胞

Ficoll-Hypaque密度梯度分离液

PBS（含2mmol/L EDTA和1%人血清或只含2mmol/L EDTA）

FITC标记的抗CD3单抗、PE标记的抗CD16单抗

荧光抗体标记的同型对照抗体

高速流式细胞分选仪

HBSS

步骤

1）取人外周抗凝血或者浓缩白细胞（分离血小板的剩余细胞）50ml，用 Ficoll-Hypaque 密度梯度法离心分离出人 PBMC。

2）用 15ml PBS（含 2mmol/L EDTA）以 300*g* 离心 5min 洗涤细胞 2 次，以 PBS（含 1%人血清和 2mmol/L EDTA）悬浮细胞至 10^8 个/ml，置于 1.5ml 离心管中 4℃备用。

3）取少许细胞（约 1×10^5 个），加入荧光抗体标记的同型对照抗体（终浓度 10μg/ml）作为对照，其余细胞加入抗 CD3、抗 CD16 单抗（终浓度 10μg/ml），4℃孵育 30min。

4）流式分析并选定 $CD3^-CD16^+$ 细胞群，用高速流式细胞分选仪分选（参见第二十五章）。

5）以 HBSS 300*g* 离心 5min 洗涤 1 次，放置于 4℃备用。

注意事项

1）在细胞分选中，为了提高细胞活力，应直接将目标细胞分选到 RPMI-1640 完全培养基中。

2）如果一次需要高度纯化的细胞太多，为了避免长时间流式分选造成细胞活力损害和降低长时间流式分选的劳动强度，应该将人 PBMC 细胞先用磁珠分离的方法预先纯化，这时磁珠分离时要采用带荧光标记的抗 CD16 抗体，这样磁珠分离后可以直接再进行流式分选。

3）流式分选后要将得到的细胞进行流式分析，判断 NK 细胞的纯度。

三、小鼠的 NK 细胞的分离

（一）补体溶解法分离小鼠 NK 细胞

小鼠的脾细胞主要含有 NK、NKT、T、B 细胞，以及单核巨噬细胞等。小鼠的 NK 细胞为 $CD3^-$、$NK1.1^+$（适用于 C57BL/6、C57BL/10 或 H2b、H2d、H2q 同系小鼠，BALB/c 小鼠不表达 NK1.1）或 $DX5^+$（泛 NK 标志抗体）细胞，而 CD4、CD8α、I-A、$I\text{-}E^{d,k}$、CD24 分子在 NK 细胞表面均无表达，利用这些分子的特异性抗体（大鼠抗小鼠抗体）的混合物加入脾细胞悬液中，使它们结合非 NK 细胞，再加入抗大鼠的二抗结合前述抗体，加入补体后，抗原-抗体复合物能够使补体活化，并溶解抗原-抗体复合物结合的细胞，从而去除非 NK 细胞，得到纯化的 NK 细胞。该方法因无直接刺激 NK 细胞的因素，不会在分离过程中使 NK 细胞受到刺激，因而在以前得到广泛应用。现在，这种方法已被磁珠阴性分离法取代，因为后者具有相同的优点，而且操作更为快速、简便。

材料与试剂

小鼠

含 3% FBS 的 HBSS（体积比）

Tris-NH_4Cl红细胞裂解液

10×单克隆大鼠抗小鼠抗体贮存液：GK1.5（抗CD4）、53-6.72（抗CD8α）、M5/114.15.2（抗I-A和$I\text{-}E^{d,k}$）、J11d. 2（抗CD24）

单克隆抗体MAR18.5（抗大鼠免疫球蛋白κ链，1mg/ml）

低Tox-M兔补体

RPMI-1640培养基

抗CD3-FITC、抗NK1.1-PE或者抗CD49b（DX5）-PE抗体

小鼠淋巴细胞分离液

15ml聚丙烯锥底离心管（注意：一定要用锥底，避免用圆底，以防洗涤过程中丢失细胞）

步骤

1）在无菌条件下取小鼠脾脏，制备脾细胞悬液，悬浮于含血清的HBSS中，200g离心5min洗涤，Tris-NH_4Cl裂解红细胞，用含血清的HBSS悬浮细胞至5×10^7个/ml，置于冰上或4℃保存备用。

2）配制抗小鼠单克隆抗体（GK1.5、53-6.72、M5/114.15.2、J11d.2）的10×混合液（10×每种抗体的饱和浓度，饱和浓度在实验前以流式染色测定），以9：1（体积比）的比例混合细胞悬液和抗体混合液，4℃孵育30min。

3）将冷HBSS以200g离心5min洗涤3次，以含血清HBSS重新悬浮细胞至5×10^7个/ml。

4）加入抗大鼠单克隆抗体MAR18.5（10μg/ml）和低Tox-M兔补体至细胞悬液（体积比一般为1：6，但最好预实验确定最佳浓度），37℃孵育45min，每10min混悬1次。

5）以HBSS洗涤1次，200g离心5min洗涤，用5ml含血清的HBSS悬浮细胞，以台盼蓝拒染法观察计数活细胞，以确定补体裂解细胞的效果。

6）将5ml小鼠淋巴细胞分离液加入15ml离心管中，5ml细胞悬液加到分离液上，室温下，于水平离心机200g离心20min。

7）对着光源以便看清界面，收集界面细胞即为NK细胞，以RPMI-1640培养基洗涤2次，以适量RPMI-1640完全培养基悬浮，台盼蓝染色计数活细胞。

8）以抗CD3-FITC、抗NK1.1-PE（适用于C57BL/6、C57BL/10或H2b、d、q同系小鼠，BALB/c小鼠不表达NK1.1）或者抗CD49b（DX5）-PE（泛NK标志抗体）抗体染色细胞，流式分析$CD3^-NK1.1^+$或者$CD3^-DX5^+$细胞的纯度。

注意事项

1）清除其他细胞所用的单克隆抗体的活性和用量对本方法非常关键，需要在预实验中确定。

2）最佳补体浓度与细胞浓度需要通过预实验确定。

3）小鼠淋巴细胞分离液可能对细胞的生长与功能带来影响，离心收集细胞后要充分洗涤干净。

（二）磁珠阳性分离小鼠 NK 细胞

NK1.1 和 CD49b 为 NK 细胞表面标志，用磁珠结合的抗 NK1.1 抗体或抗 CD49b 抗体（DX5 克隆）与脾细胞共孵育后，过磁柱，洗涤掉未结合的细胞后，收集结合磁柱的细胞即为 NK 细胞。不过，因为在小鼠中，NKT 细胞也表达有 NK1.1 和 CD49b 这些分子，虽然其表达比 NK 细胞弱，但是用此法分离得到的 NK 细胞中仍含有 NKT 细胞。另外，NK1.1 适用于 C57BL/6、C57BL/10 或 H2b、d、q 同系小鼠，BALB/c 小鼠不表达 NK1.1；CD49b（DX5）为泛 NK 标志抗体，但是血小板也为 DX5 阳性，应引起注意。

材料与试剂

小鼠脾细胞悬液

PBS（含 2mmol/L EDTA 和 1% FBS 或含 2mmol/L EDTA）

抗 NK1.1，或抗 CD49b（DX5）抗体（如果磁珠分选后要继续用流式分选高度纯化，可以直接用带荧光的抗体标记）

羊抗小鼠 IgG 包被的磁珠

MS 柱或者 LS 柱

磁铁架

步骤

1）脾细胞准备：取小鼠脾细胞，用 Tris-NH_4Cl 裂解红细胞后，用 15ml PBS（含 2mmol/L EDTA）以 300*g* 5min 离心洗涤细胞 2 次，以 PBS（含 1% FBS，2mmol/L EDTA）悬浮细胞至 10^8 个/ml，置于 1.5ml 离心管中 4℃备用。

2）抗体标记：将抗 NK1.1 或抗 CD49b（DX5）抗体加入细胞中（终浓度为 10μg/ml），4℃或者冰浴 30min。

3）结合磁珠：用冷 PBS（含 2mmol/L EDTA）以 700*g* 30s 洗涤细胞 2 次，以 0.8ml PBS（含 1% FBS，2mmol/L EDTA）重悬 10^8 个细胞，加入 0.2ml 羊抗小鼠 IgG 包被的磁珠，4℃孵育 30min，并每 5min 振荡 1 次。

4）洗涤：用 PBS（含 2mmol/L EDTA）以 700*g* 30s 洗涤细胞 2 次，以 1ml PBS（含 1% FBS，2mmol/L EDTA）重悬细胞，室温备用。

5）过磁柱：MS 柱或者 LS 柱安装于磁铁架上，用 1ml PBS（含 1% FBS，2mmol/L EDTA）预洗柱子 3 次，然后将上述细胞悬液加入柱子中，收集流出液，再加入柱子中，以 1ml PBS（含 2mmol/L EDTA）洗涤柱子 10 次。

6）获得阳性细胞：取下分离柱，用 3ml PBS（含 1% FBS，2mmol/L EDTA）冲洗下磁珠结合的细胞，300*g* 离心 5min，反复 3 次，以适量的 HBSS 重悬细胞，置于 4℃备用。

7）质量控制：细胞计数，并以流式细胞仪分析磁珠分离的效果。

注意事项

1）磁珠分离后要流式测定分离效果，以确保后续实验的准确性。

2）如果磁珠分离后还要进行流式分选，则步骤2）应该使用带荧光标记的抗体，这样磁珠分离后可以直接进行进一步流式分选。

（三）磁珠阴性分离小鼠NK细胞

小鼠的NK细胞的表型特征为：$DX5^{+}$ $CD19^{-}$ $CD4^{-}$ $CD8\alpha^{-}$ $CD5^{-}$ $Gr\text{-}1^{-}$ $Ter\text{-}119^{-}$，因此，用磁柱分离的方法去掉脾细胞中的T细胞、B细胞、单核巨噬细胞、粒细胞和红细胞即能够分离得到纯度较高的NK细胞。

材料与试剂

小鼠脾细胞悬液

PBS（含2mmol/L EDTA和1%人血清，或只含2mmol/L EDTA）

生物素标记的抗CD19、CD4（L3T4）、CD8α（Ly-2）、CD5（Ly-1）、Gr-1（Ly6G/C）和Ter-119抗体

抗生物素抗体包被的微磁珠

MS柱或LS柱

磁铁架

步骤

将以上磁珠阳性分离小鼠NK细胞的方法中步骤2）加入的抗体换作生物素标记的抗CD19、CD4（L3T4）、CD8α（Ly-2）、CD5（Ly-1）、Gr-1（Ly-6G/C）和Ter-119鸡尾酒抗体混合物。步骤3）加入的磁珠换作带抗生物素标记的微磁珠，过磁柱，丢弃与磁柱结合的细胞，最后收集流脱的细胞即为NK细胞。

注意事项

1）用于阴性分离的抗体特异性及最佳抗体浓度较为重要，需要在实验前预实验确定。

2）抗体的Fc段能够与NK细胞表面的FcR非特异结合，因此，阴选时最好用抗体的Fab段，只是价格较贵。

3）分选完成后，要流式测定分离效果，以保证随后实验的准确性。

（四）流式分选法纯化小鼠NK细胞

小鼠的NK细胞为$CD3^{-}$ $NK1.1^{+}$（适用于C57BL/6、C57BL/10或H2b、H2d、H2q同系小鼠，BALB/c小鼠不表达NK1.1）或$CD3^{-}$ $DX5^{+}$（DX5为泛NK标志抗体）细胞，利用带有荧光标记的抗CD3抗体和抗NK1.1或DX5抗体标记小鼠脾细胞，即可在流式分选仪上圈定$CD3^{-}NK1.1^{+}$或$CD3^{-}DX5^{+}$细胞，将它们分选出来，如此得到的NK细胞纯度高，可以达到98%以上，此为阳选法，如果考虑到NK细胞结合抗体后会被刺激活化等因素，可以用非NK标志的荧光标记的抗体标记小鼠脾细胞，分选去掉非NK细胞，只收集无荧光标记的细胞即为NK细胞，此方法可以参考磁珠分离小鼠NK细胞阴选方法中的抗体组合，只是如果采用阴选的方法，因为所用的荧光抗体较多，所以成本要比阳选高得多。以下只介绍流式阳选的方法，阴选可以参照进行。

材料与试剂

小鼠脾细胞悬液

Tris-NH_4Cl红细胞裂解液

PBS（含2mmol/L EDTA或含1% FBS和2mmol/L EDTA）

HBSS

抗CD3-FITC和抗NK1.1-PE单抗

荧光标记的同型对照抗体

高速流式细胞分选仪

RPMI-1640完全培养基（含10% FBS）

步骤

1）脾细胞准备：取小鼠脾细胞，用Tris-NH_4Cl裂解红细胞后，用15ml PBS（含2mmol/L EDTA）以300*g* 5min离心洗涤细胞2次，以PBS（含1% FBS和2mmol/L EDTA）悬浮细胞至10^8个/ml，置于1.5ml离心管中4℃备用。

2）抗体标记：取少许细胞（约1×10^5个），加入荧光抗体标记的同型对照抗体（终浓度10μg/ml）作为对照，其余细胞加入抗CD3-FITC、抗NK1.1-PE单抗（终浓度10μg/ml），4℃孵育30min。

3）流式分选：流式分析并选定$CD3^-$ $NK1.1^+$细胞群，用高速流式细胞分选仪分选。分选所得细胞，以300*g*离心5min，用适量HBSS或者RPMI-1640完全培养基（根据后续实验步骤的需要选择）重悬细胞，放置于4℃备用。

注意事项

1）脾细胞在裂解红细胞后有大量的细胞碎片，要通过离心方法尽量洗涤干净，否则将影响流式分选时的纯度和得率。

2）为了提高细胞活力，应直接将目标细胞分选到RPMI-1640完全培养基中。

3）如果一次需要高度纯化的细胞太多，为了避免长时间流式分选造成细胞活力损害和降低长时间流式分选的劳动强度，应该将小鼠脾细胞先用磁珠分离的方法预先纯化，这时磁珠分离时要采用带荧光标记的抗NK1.1抗体，这样磁珠分离后可以直接再进行流式分选。

4）流式分选后要将得到的细胞进行流式分析，判断NK细胞的纯度，以保证后续实验的准确。

5）NK1.1只适用于C57BL/6、C57BL/10或H2b、H2d、H2q同系小鼠，如果要分选BALB/c小鼠的NK细胞，可以用DX5（泛NK标志抗体）代替抗NK1.1抗体。

第三节　NK细胞的功能检测

现在的研究发现，NK细胞并非单一性的群体，而且功能多样。NK细胞不但抗肿瘤、抗感染、参与移植排斥，还能够调节机体的免疫、协助造血、影响胎儿发育，以及

与各种组织细胞相互作用。NK细胞的这些功能与NK细胞的表面功能性分子的表达、对靶细胞的自然杀伤活性、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，ADCC），以及分泌细胞因子的能力等密切相关，因此通常通过在体外检测NK细胞表面功能性分子的表达、杀伤活性、细胞因子分泌的水平来反映NK细胞的功能活性。在此，仅对NK细胞杀伤功能的测定做一介绍。

NK细胞能够杀伤清除转化的细胞、有胞内感染的细胞和某些未成熟的正常细胞。不过，与T细胞相比，它们不需要预先免疫或者抗原致敏。其杀伤过程可人为分为三步：①NK细胞识别靶细胞：NK细胞要通过表面的分子识别靶细胞，如识别与MHC-Ⅰ类分子形成复合物的自身肽，能够抑制NK介导的细胞溶解，否则将识别为靶细胞；②NK细胞的活化：NK细胞表面分布有大量的活性受体和抑制性受体，它们与靶细胞的相应配体结合，其信号平衡能够决定NK细胞被活化或者被抑制（Moretta，2001；Yokoyama，2003；Raulet，2001；Long，2008；Lanier，2008）；③NK细胞杀伤靶细胞：NK细胞被激活后，释放胞内的穿孔素和颗粒酶等杀伤物质杀伤靶细胞。另外，经过细胞因子活化的NK细胞（如IL-2刺激NK后产生的LAK细胞），能够克服某些抑制性信号的作用，表现为能够杀伤NK抵抗的靶细胞（如Daudi细胞）。

检测NK细胞杀伤功能的实验方法有多种，一般根据被杀伤的靶细胞的特点来检测。如图3-1所示，正常的活细胞因为细胞膜完整，台盼蓝、PI、7-AAD等物质不能进入细胞内，胞质内的酶类（如LDH）也不能透出细胞膜，但是像H-胸腺嘧啶核苷（^{3}H-TdR）、$Na_2{}^{51}CrO_4$却能随着细胞的代谢轻易地进入细胞内，与蛋白质相结合。当靶细胞被杀伤后，细胞膜的通透性增加使细胞发生如下显著的变化：台盼蓝、PI、7-AAD等物质能够进入死细胞内，结合DNA而使细胞染色；胞质内的酶类（如LDH）能够透过细胞膜释放到胞外；靶细胞被预先标记的^{3}H、^{51}Cr等也随着胞内蛋白质的外流而释放到胞外。另外，活细胞到死亡细胞的过程可能经过凋亡的中间阶段，凋亡细胞一个显著的特点是磷脂酰丝氨酸（PS）外翻到细胞表面，可以被Annexin V特异地结合。根据靶细胞被杀伤后凋亡或者死亡的上述特点，现在发展出多种检测NK细胞杀伤功能的实验方法，根据灵敏度由高到低排列为：Annexin V/7-AAD标记流式检测法、^{51}Cr释

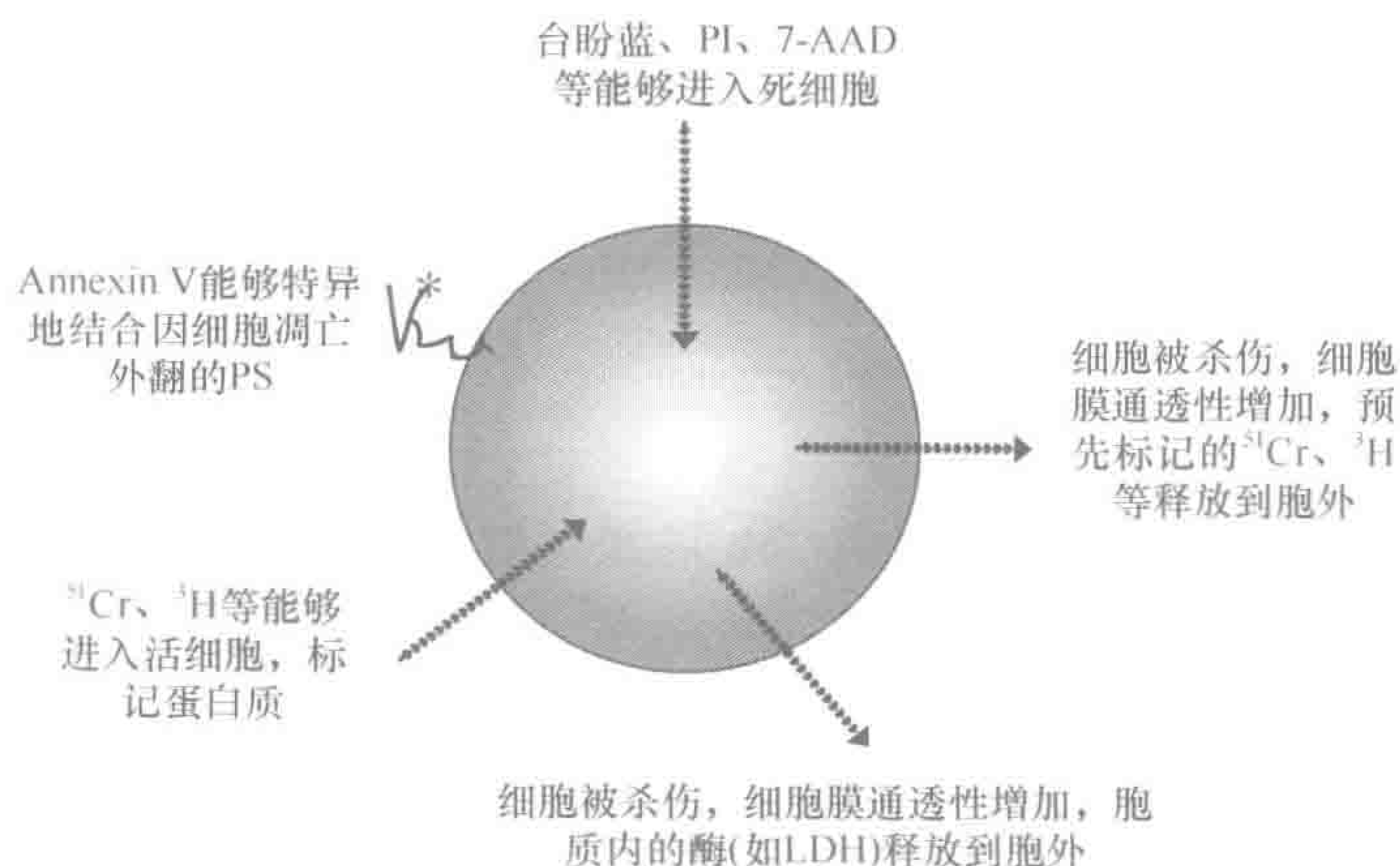


图3-1 检测靶细胞是否被杀伤的几种途径

放检测法、LDH 释放检测法、形态学检测法。现将 NK 细胞杀伤功能实验中靶细胞的选择及各种检测方法分述如下。

一、靶细胞的选择

在体内，NK 细胞的靶细胞主要有某些肿瘤细胞（包括部分细胞系）、病毒感染细胞、某些自身组织细胞（如巨噬细胞、肝细胞）、寄生虫等。在健康的个体中，位于外周血以及脾脏的大多数的 NK 细胞处于静息状态，这意味着仅有某些肿瘤细胞系容易被 NK 细胞溶解（如人的 K562 细胞，小鼠的 YAC-1 细胞），而绝大多数的肿瘤细胞都是 NK 细胞抵抗的。所以在体外杀伤实验中，检测人的 NK 细胞杀伤活性通常用 K562（人慢性骨髓瘤白血病细胞株，ATCC＃243）细胞株；检测小鼠的 NK 细胞杀伤活性通常用 YAC-1（小鼠淋巴瘤细胞株）细胞株。正常人的 NK 细胞体外经 IL-2 等细胞因子预处理后，可诱导出 LAK 细胞活性，其杀伤活性一般用 NK 抵抗的细胞株 Daudi（人 Burkit 淋巴瘤细胞株，ATCC＃213）或 Colo205（人结肠癌细胞株，ATCC＃CCL-222）来检测。

二、形态学检测法

靶细胞与 NK 细胞接触并被杀伤死亡后，其细胞膜通透性改变，使台盼蓝染料能够透入细胞，与解体的 DNA 结合使其着蓝色，无折光性；而未被杀伤的正常活细胞，因胞膜结构完整，能够排斥台盼蓝，使其不能透入活细胞内，无蓝染，折光强，所以可用此方法计算出靶细胞死亡率，来代表 NK 细胞的杀伤活性。台盼蓝染色鉴别死细胞和活细胞的方法，为实验入门级的方法，实验中常用，而如果有大量样本，需要得到精确的细胞杀伤数据时则一般不用此法。

材料与试剂

靶细胞：通常检测人的 NK 细胞杀伤活性用 K562 细胞株，检测小鼠 NK 细胞杀伤活性用 YAC-1 细胞株，或者其他适合的细胞（如肿瘤细胞等）作为靶细胞，选用的靶细胞要传代换液后 24h 内应用

NK 细胞：由人血 PBMC、小鼠脾脏、肝脏等分离

RPMI-1640 完全培养基（含 10% FBS）

圆底 96 孔板

0.5%台盼蓝

步骤

1）靶细胞的制备：取传代后培养 24h 的靶细胞，以 RPMI-1640 完全培养基洗涤（300*g* 离心 5min），用 0.5% 台盼蓝染色检测，确保活细胞大于 95%，用 RPMI-1640完全培养基重悬至 2×10^5 个/ml 备用。

2）NK 细胞的制备：从人血 PBMC 或者小鼠脾细胞中纯化 NK 细胞，以 RPMI-1640 完全培养基洗涤（500*g* 离心 5min）后，用 RPMI-1640 完全培养基重悬至 1×10^7 个/ml 备用。

3）效-靶细胞共孵育：用圆底 96 孔板，对照组与实验组各设 3～6 个复孔，每孔加入靶细胞 1×10^4 个，对照组不加入 NK 细胞，实验组按照效靶比 50∶1、20∶1、10∶1、5∶1 加入纯化的 NK 细胞，将培养基补充到 200μl，混匀，于 37℃，5% CO_2 环境中培养过夜。

4）台盼蓝染色与结果计算：将板孔中的细胞轻轻混匀，每孔取出 30μl 细胞悬液与等量的 0.5%的台盼蓝染液混合，室温下 5～10min 内用白细胞计数板计数，对照组与实验组每孔各计数 100 个细胞，计算每组死亡细胞数的平均值，按下式计算：NK 细胞杀伤率（%）＝（实验组死亡靶细胞数平均值－对照组死亡靶细胞数平均值）×100。

注意事项

1）用台盼蓝染色要在镜下计数每一组细胞的活细胞和死细胞比，每组最少要计数 100 个细胞，比较耗时耗力，但是尽量由同一个人完成，以避免人为误差。

2）台盼蓝对人体有毒，注意防止沾染到皮肤上。

3）台盼蓝染细胞时，时间不宜过长。否则，部分活细胞也会着色，干扰计数的准确性。

三、同位素释放实验：^{51}Cr 释放检测法

$Na_2{}^{51}CrO_4$ 能进入到活细胞内，与细胞质蛋白质牢固地结合。当标记了^{51}Cr 的靶细胞受到 NK 细胞攻击，靶细胞被损伤或死亡之后，即可释放出^{51}Cr。^{51}Cr 辐射 γ 射线，通过测定受损伤或死亡靶细胞释放到上清中的^{51}Cr 的放射脉冲数（cpm），即可计算出 NK 细胞活性。

标记蛋白质的^{51}Cr 不依赖于蛋白质的合成，可以不受细胞类型以及是否增殖的限制，本法操作简便、快速、客观、敏感、可定量。缺点是自然释放率高，所需靶细胞数量多，^{51}Cr 半衰期短，试验设备要求较高，并存在放射性同位素污染。另外，为了更好地细胞内结合，[^{51}Cr]$^{6+}$必须转换为 [^{51}Cr]$^{3+}$，这意味着，代谢活性低的细胞可能^{51}Cr标记不充分。此方法曾被广泛应用于精确的细胞杀伤检测，目前仍是主要方法之一，但鉴于其较强的放射性等因素，人们一直在探索其他的取代方法。

材料与试剂

靶细胞、效应细胞、RPMI-1640 完全培养基同形态学检测法

$Na_2{}^{51}CrO_4$ 溶液：注意其半衰期为 27.72d

2%的十二烷基硫酸钠溶液（SDS；可以用 Triton X-100 代替）：以生理盐水配制

圆底 96 孔细胞培养板

步骤

1）靶细胞的制备和标记：取培养 24h 的靶细胞，台盼蓝检测细胞活力，细胞计数并将 2×10^6～10×10^6 个活细胞加入 1.5ml 离心管中，200*g* 离心 5min，弃上清，用装有 25G 针头的 1ml 注射器加入 100～200μCi 的 $Na_2{}^{51}CrO_4$（原液浓度为 5mCi/ml），混匀细胞，37℃，5% CO_2标记 1h，每 15min 混匀一次，最后用

RPMI-1640 完全培养基 200g 离心 5min 洗涤 3 次以去除游离的 $Na_2{}^{51}CrO_4$，用 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞至 1×10^5 个/ml，4℃冰箱备用。

2）NK 细胞的制备：用以上方法从人 PBMC 或者小鼠的脾细胞中分离 NK 细胞，用 RPMI-1640 完全培养基调整细胞浓度至 1×10^7 个/ml，4℃备用。

3）效-靶细胞共孵育：靶细胞按照 1×10^4 个/孔铺设到圆底 96 孔板中，以不同的效靶比（如 50∶1、25∶1、10∶1、5∶1、1∶1 等）将 NK 细胞加入板孔中，每标本设 3 个复孔，同时设立自然释放对照孔（0.1ml 靶细胞加 0.1ml RPMI-1640 完全培养基）和最大释放对照孔（0.1ml 靶细胞加 0.1ml 2%的 SDS），每孔补齐液体 200μl，置于 37℃，5% CO_2 下孵育 4h。

4）cpm 值测定：轻轻取出培养板，每孔吸出上清 0.1ml，放入 1.5ml 离心管内。用 γ 计数仪测量其 cpm 值。

5）结果计算：根据下式计算^{51}Cr 自然释放率和 NK 细胞杀伤活性：^{51}Cr 自然释放率（%）＝（自然释放对照孔 cpm 均值/最大释放对照孔 cpm 均值）×100；NK 细胞杀伤活性（%）＝［（实验孔 cpm 均值－自然释放对照孔 cpm 均值）/（最大释放对照孔 cpm 均值－自然释放对照孔 cpm 均值）］×100。

注意事项

1）^{51}Cr 自然释放率要小于 10%，否则说明靶细胞状态不好，死细胞太多。

2）最好用处于对数生长的靶细胞，如果死细胞太多，可以用 35% Percoll 预离心去除死细胞和细胞碎片。

3）要根据预实验结果设置适当的效靶比，以能够更清晰地判断杀伤效果。

4）在效-靶细胞共孵育后，吸出上清时，不要吸出细胞，或者在吸出上清后，以 200g 离心 5min 以去除细胞。

5）加入孔中的靶细胞不能太少，靶细胞的核素标记率不能太低，否则实验误差会加大。

6）要根据核素的半衰期，适当调整需要的核素用量。

7）最大释放孔中的 2% SDS 可以用 Triton X-100 代替。

8）因为^{51}Cr 的放射性较强，会对身体造成损害，要注意实验防护措施到位，实验前最好详细规划好所用各种细胞的用量、液体用量、吸取顺序，以减少近距离操作时间，另外要按照实验室核素材料标准程序处理实验废物，避免环境污染。

四、LDH 释放检测法

乳酸脱氢酶（LDH）是活细胞胞质内存在的一种酶。正常情况下，LDH 分子较大而不能透过细胞膜。当靶细胞受到 NK 细胞的攻击而受损时，细胞膜通透性增加，LDH 可释放到细胞外。释放出来的 LDH 在催化乳酸生成丙酮酸的过程中，使氧化型辅酶Ⅰ（NAD^+）变成还原型辅酶Ⅰ（$NADH_2$）。后者再通过递氢体——吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS）还原碘硝基氯化氮唑蓝（INT）或硝基蓝四氮唑（NBT），形成有色的甲臜类化合物，在 570nm 波长处有一高吸收峰。利用读取的 OD 值，经过计算即可得知 NK

细胞杀伤靶细胞的活性。

该法的优点是敏感、需要的细胞数量少、经济、快速、简便，并可做定量测定，细胞不需要洗涤，无放射性危害。缺点是LDH分子较大，靶细胞膜严重破损时才能被释出，故不能较早地反映效应细胞的功能。

材料与试剂

靶细胞

纯化的NK细胞

RPMI-1640完全培养基（含10% FBS）

平底96孔板

LDH底物溶液：临用前现配。硝基氯化四氮唑蓝（NBT）4mg，氧化型辅酶Ⅰ（NAD^+）10mg，吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS）1mg，加双蒸水2ml，混匀溶解，取上清1.6ml加1mol/L乳酸钠0.4ml，加0.1mol/L PB（pH7.4）至10ml

1% NP-40

1mol/L柠檬酸

步骤

1）靶细胞的制备：取传代后培养24h的靶细胞，以RPMI-1640完全培养基洗涤（300*g*离心5min），用0.5%台盼蓝染色检测，确保活细胞大于95%，用RPMI-1640完全培养基重悬至2×10^5个/ml备用。

2）NK细胞的制备：从人血PBMC或者小鼠脾细胞中纯化NK细胞，以RPMI-1640完全培养基洗涤（500*g*离心5min）后，用RPMI-1640完全培养基重悬至1×10^7个/ml备用。

3）效-靶细胞共孵育：用圆底96孔板，对照组与实验组各设3～6个复孔，每孔加入靶细胞1×10^4个，自然释放对照组不加入NK细胞，最大释放组加入0.1ml 1% NP-40，实验组按照效靶比50∶1、20∶1、10∶1、5∶1加入纯化的NK细胞，将培养基补充到200μl，混匀，1000r/min离心2min，于37℃，5% CO_2环境中培养2h。

4）LDH酶促反应：将培养孔混匀，然后以500*g*离心5min，每孔吸出0.1ml上清，加入另一平底96孔板中，37℃预热10min，加入新配制的底物溶液0.1ml/孔，室温避光15min，加入柠檬酸终止液30μl/孔。

5）OD值测定与结果计算：酶联仪570nm波长读取OD值，计算各组复孔的平均值，按下式计算：NK细胞杀伤率(%)=[(实验组平均OD值－自然释放组平均OD值)/(最大释放组平均OD值－自然释放组平均OD值)]×100。

注意事项

1）要确保靶细胞的质量，这对实验的稳定性至关重要，要用处于对数生长期的靶细胞，保证台盼蓝染色死细胞小于5%，或者靶细胞自然释放率小于10%，如果死细胞太多，要用35%的Percoll离心去除其中的死细胞和细胞碎片。

2）吸取细胞上清时，不要吸到沉淀的细胞，如果不小心使沉淀细胞漂浮起来，可

将细胞培养板预先离心后再吸取上清。

五、Annexin V/7-AAD 标记流式检测法

正常情况下，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine，PS）位于细胞膜内层，在细胞发生凋亡的早期，PS 即从细胞膜内翻转并暴露在细胞膜外层，为凋亡早期的一个标志。Annexin V 为一种具有强力抗凝作用的血管蛋白，它与 PS 间具有高度亲和力。

放线菌素 D（7-AAD）是一种核酸染料，它不能通过正常的细胞膜，但是在细胞凋亡、死亡过程中，细胞膜对 7-AAD 的通透性逐渐增加，7-AAD 在细胞内结合 DNA 而显色，可以通过 7-AAD 的染色强弱判断细胞的状态：7-AAD 染色强为死亡细胞，7-AAD染色弱为凋亡细胞，7-AAD^- 为正常活细胞。7-AAD 同 PI 有着相似的荧光特性，但其发射波谱较 PI 窄，对其他检测通道的干扰更小，在多色荧光分析中是 PI 的最佳替代品，可与 FITC、PE 标记的抗体联合使用，而如果用 PI 与 FITC、PE 标记的抗体联合使用，调节 PI 与 PE 的补偿将带来不小的挑战。

通过 Annexin V-FITC 和 7-AAD 双染色细胞，可以更为精确地区分细胞的状态：Annexin V- FITC^-/7-AAD^- 细胞为正常的活细胞；Annexin V-FITC^+/7-AAD^- 细胞为凋亡细胞；Annexin V-FITC^+/7-AAD^+ 细胞为死亡细胞。同 NK 细胞杀伤靶细胞的体系中，用 Annexin V-FITC 和 7-AAD 双染色细胞，区分细胞的活力状态，再用 PE 标记的抗体来标记 NK 细胞，就能够轻易地分析出杀伤培养体系中靶细胞的凋亡、死亡情况，由此计算出 NK 细胞的杀伤活性。Annexin V-FITC 和 7-AAD 双染色不仅能标记出死细胞，而且能够标记出早期死亡细胞，比台盼蓝拒染法、^{51}Cr 释放法、LDH 释放法更为灵敏（Zhang et al.，2009）。

材料与试剂

靶细胞

纯化的 NK 细胞

RPMI-1640 完全培养基（RPMI-1640 含 10% FBS）

0.5%台盼蓝

Annexin V 标记专用缓冲液（含 Ca^{2+}）

人抗 CD16-PE 抗体，小鼠抗 NK1.1-PE 或抗 CD49b（DX5）-PE 抗体

Annexin V-FITC

7-AAD

96 孔圆底板

流式细胞仪

步骤

1）靶细胞的制备：取传代后培养 24h 的靶细胞，以 RPMI-1640 完全培养基洗涤（300g 离心 5min），用 0.5% 台盼蓝染色检测，确保活细胞大于 95%，用 RPMI-1640完全培养基重悬至 2×10^5 个/ml 备用。

2）NK 细胞的制备：从人血 PBMC 或者小鼠脾细胞中纯化 NK 细胞，以 RPMI-

1640完全培养基洗涤（500g离心5min）后，用RPMI-1640完全培养基重悬至1×10^7个/ml备用。

3）效-靶细胞共孵育：用96孔圆底板，对照组与实验组各设3～6个复孔，每孔加入靶细胞1×10^4个，对照组不加入NK细胞，实验组按照效靶比50∶1、20∶1、10∶1或5∶1加入纯化的NK细胞，将培养基补充到200μl，混匀，于37℃，5% CO_2环境中培养4 h。

4）FACS检测与结果计算：收集细胞，用Annexin V标记的专用缓冲液重悬细胞，人的NK细胞以抗CD16-PE抗体，小鼠的NK细胞以抗NK1.1-PE（适用于C57BL/6、C57BL/10或H2b、d、q同系小鼠，BALB/c小鼠不表达NK1.1）或者抗CD49b（DX5）-PE抗体（泛NK标志抗体）染色，并用Annexin V-FITC染色，4℃，30min，以冷Annexin V标记的专用缓冲液洗涤后，流式细胞仪分析前5min，以7-AAD染色，不用洗涤，直接上机检测。NK细胞杀伤率（%）＝（PE^-细胞－$PE^-FITC^-7\text{-}AAD^-$细胞）/（PE^-细胞）×100。

注意事项

1）如果流式细胞仪能够检测APC，带PE的抗体可以用APC标记的抗体取代。

2）7-AAD一般占用流式第三通道（FL3），可以用PI来代替，不过由于PI发射光谱较广，与PE的补偿调整可能带来挑战，此时，可以将抗NK的抗体用APC标记的抗体替代。

3）7-AAD不能染色时间过长，一般染色后5～10min内检测完毕，如果染色时间太长，部分正常细胞也会染上少许颜色，影响实验的准确性。

4）要确保靶细胞状态良好，死细胞少，实验前可以用35%的Percoll去除其中的死细胞和细胞碎片，以免干扰流式检测。

5）因为Annexin V是一种Ca^{2+}依赖的磷脂结合蛋白，所以流式标记、洗涤、上样等过程都必须应用Annexin V标记专用缓冲液，中间步骤一旦因失误等原因误用了不含Ca^{2+}的其他缓冲液，即应更换样品细胞，从头开始染色。

第四节 小鼠体内删除NK细胞

在NK细胞的功能实验中，除体外杀伤活性等功能实验外，还经常用到体内实验来验证NK细胞在体内的功能、状态，以及在某些疾病条件下的作用等，这时，常常用到体内删除和过继回输NK细胞的实验。NK细胞过继回输一般经静脉进行，体内删除NK细胞可应用PK136单抗（抗NK1.1抗体，特异删除$NK1.1^+$的细胞）、抗asialo GM1抗体（能够删除NK细胞，使用量过大可能删除部分单核细胞和T细胞）和抗Ly49抗体（能够删除绝大多数成熟的NK细胞），各种抗体的特点和方法列举如下：①PK136单抗：杂交瘤细胞系PK136由SP2/0-Ag14骨髓瘤和用CE小鼠脾细胞和骨髓细胞免疫的（C3H × BALB/c）F1小鼠的脾细胞融合而成。PK136分泌的单克隆抗体（IgG2a）为小鼠NK1.1的特异性抗体，在有补体存在时，该抗体结合的NK细胞能够

被特异性地清除，为常用的体内清除 NK 细胞的单克隆抗体。但是 NK1.1 只表达于 C57BL/6、C57BL/10 或 H2b、H2d、H2q 同系小鼠，而 BALB/c、SJL、AKR、CBA、C3H 小鼠等不表达 NK1.1。另外，NK1.1 还表达于 NKT 细胞，应用 PK136 抗体体内删除 NK 细胞时，也能够同时删除 NKT 细胞，在实验时应引起注意。②抗 asialo GM1 抗体：研究表明，NK 细胞表面表达糖脂唾液酸神经节苷脂 asialo GM1，高浓度的抗 asialo GM1 抗体也与小鼠的单核细胞、胚胎胸腺细胞及一小群 T 细胞起反应。用抗 asialo GM1 单抗和补体能够有效地删除小鼠和大鼠 NK 细胞，也是常用的体内删除 NK 细胞的抗体。但是必须注意的是，如果大剂量应用该抗体体内注射，可以删除部分的单核细胞和部分 T 细胞。③抗 Ly49 抗体：Ly49 为表达于成熟 NK 细胞的功能性受体，在该家族中，Ly49D、Ly49H、Ly49P 为活化性受体，Ly49A-C、E-G、I-O 为抑制性受体。但应注意，Ly49 受体为成熟 NK 细胞的标志性受体之一，绝大多数非成熟 NK 细胞不表达该受体，但是 Ly49 受体也表达于 NKT 细胞，所以，应用抗 Ly49 抗体体内注射时，只能删除成熟 NK 细胞、$Ly49^+$ 的 NKT 细胞，但是未成熟的 NK 细胞得以保留。

材料与试剂

小鼠（注意 PK136 抗体只能用于 C57BL/6、C57BL/10 或 H2b、H2d、H2q 同系小鼠）

PK136 单抗（抗 NK1.1）、抗 asialo GM1 抗体或抗 Ly49 抗体

1ml 注射器

荧光标记的 NK1.1 抗体（只能用于 C57BL/6、C57BL/10 或 H2b、H2d、H2q 同系小鼠），DX5 抗体（泛 NK 细胞标志）

步骤

1）用 1ml 注射器吸取 PK136 单克隆抗体（200～500μg/只）、抗 asialo GM1 抗体（200μg /只）或抗 Ly49 抗体（100μg/只），经腹腔注射到小鼠体内。

2）在 24h、48h 和 72h 各取小鼠外周血一滴或摘取脾脏制备脾细胞悬液，以 Tris-NH_4Cl 裂解红细胞。

3）以荧光标记的 NK1.1 抗体或 DX5 抗体染色细胞，流式检测确定体内删除 NK 细胞是否成功，一般起效时间为 1～3d。

注意事项

1）NK1.1 不仅表达于 NK 细胞，还表达于 NKT 细胞，在用 PK136 进行体内删除实验时，NK 及表达 NK1.1 的 NKT 细胞将同时被删除。

2）Ly49 抗体同样也表达于 NKT 细胞，应用抗 Ly49 抗体也将删除部分 NKT 细胞。

3）应用以上两种抗体时，可以适当应用 CD1d 缺陷小鼠（NKT 缺陷）为模型，排除 NKT 对实验的影响。

4）抗 asialo GM1 抗体也能删除一小群 $CD8^+$ T 细胞，应引起注意。

5）每一个批次制备的抗体的效价可能不一，用前要用上述方法预实验确定其有效

性，并确定抗体的有效用量。

6）根据笔者的经验，注射抗体时，也可以经尾静脉注射，起效将会更快，但体内抗体的清除时间也将更快，NK细胞恢复的时间将快于腹腔注射。

7）体内注射的抗体必须注意无菌，否则可能使实验动物发生急性感染，极大地改变体内的免疫环境，致使实验失败，甚至引起动物死亡。

8）NK细胞恢复的时间会随着抗体使用量的升高而延迟。

9）如果要在一个较长时间内持续删除NK细胞，需要根据预实验测定的NK细胞恢复时间间断给药。

第五节 NKT细胞

自然杀伤性T细胞（nature killer T cell，NKT）是一类重要的具有免疫调节功能的T细胞群，因其表面具有NK细胞的典型标志，如鼠NK1.1/人CD161和Ly49家族的成员，又具有T细胞的表面标志性抗原受体（T cell receptor，TCR），不同于常规的T细胞，因此称之为NKT细胞，约占小鼠外周血中T细胞的1%。但是在人体内，NKT可以泛称为表达有CD16、CD56或CD161（即NK1.1）的T细胞，但与小鼠相比，$CD161^+$的T细胞可达15%，而且其TCR、CD4、CD8的表达呈现多样性，其中，只有一小部分是真正的NKT细胞，表达有CD1d反应性的恒定链Vα24-JαQ TCRα。

NKT细胞识别的抗原分子不同于常规的T细胞，它们识别的抗原不是蛋白肽，而是脂类或糖脂，并且只识别来自于CD1分子提呈的抗原。NKT细胞具有独特的限制性表达TCR库，其具有恒定的TCRα链；在小鼠，其α链由*Vα14-Jα18*基因重排编码，β链由*Vβ8.2/Vβ7/Vβ2*基因重排编码。人类NKT细胞研究较少，目前已知其TCRα链多由*Vα24-JαQ*基因重排编码，β链由*Vβ11*基因重排编码。

NKT细胞为固有免疫细胞，可通过其TCR识别结合树突状细胞表面CD1d提呈的糖脂类抗原而被活化，也可通过其表面组成性表达的IL-12R和IL-2R与相应细胞因子结合而被活化。活化的NKT细胞具有细胞毒作用，可通过分泌穿孔素和表达FasL等，使肿瘤和病毒感染的靶细胞溶解破坏或发生凋亡；也可分泌IL-4和IFN-γ等细胞因子，因而对免疫反应起着重要的调节作用。目前的研究发现，NKT细胞大量聚集于肝脏内，是体内具有抗病毒、抗肿瘤作用的免疫效应细胞，也是重要的免疫调节细胞。

本节将分别介绍人和小鼠NKT细胞的分离与培养及其克隆培养方法。

一、人NKT细胞的分离与培养

（一）人NKT细胞的磁珠分离

人的NKT细胞TCRα链多由*Vα24-JαQ*基因重排序列编码，β链由*Vβ11*基因重排序列编码。用抗Vα24单抗或抗6B11单抗（CD1d反应性的恒定Vα24-JαQ TCR链的特异抗体）标记细胞，并连接磁珠，即能够通过阳性选择分离得到纯的NKT细胞。此方法是目前分离人NKT细胞最常使用的方法，具有省时、操作简便、效率高等优点。只

是此方法得到的细胞并不能包括所有的 NKT 细胞。

材料与试剂

人外周抗凝血或者浓缩白细胞

Ficoll-Hypaque 密度梯度分离液

PBS（含 2mmol/L EDTA 及 1%人血清，或只含 2mmol/L EDTA）

单抗 Vα24 或者 6B11

羊抗小鼠 IgG 包被的磁珠

MS 柱或者 LS 柱

磁铁架

T 细胞培养基（RPMI-1640 含 10% FBS，15mmol/L HEPES，1∶100 非必需氨基酸，1∶100 必需氨基酸，4mmol/L 谷氨酰胺，55μmol/L 2-巯基乙醇）

步骤

1）取人外周抗凝血或者浓缩白细胞（分离血小板的剩余细胞）50ml，用 Ficoll-Hypaque 密度梯度法离心分离出人 PBMC。

2）用 15ml PBS（含 2mmol/L EDTA）以 300*g* 离心 5min 洗涤细胞 2 次，以 PBS（含 1%人血清，2mmol/L EDTA）悬浮细胞至 10^8 个/ml，置于 1.5ml 离心管中 4℃备用。

3）将单抗 Vα24 或者 6B11 加入细胞中（终浓度为 10μg/ml），4℃或者冰浴 30min。

4）用冷 PBS（含 2mmol/L EDTA）以 700*g* 离心 30s 洗涤细胞 2 次，以 0.8ml PBS（含 1%人血清，2mmol/L EDTA）重悬 10^8 个细胞，加入 0.2ml 羊抗小鼠 IgG 包被的磁珠，4℃孵育 30min，并每 5min 振荡一次。

5）用 PBS（含 2mmol/L EDTA）以 700*g* 30s 洗涤细胞 2 次，以 1ml PBS（含 1%人血清，2mmol/L EDTA）重悬细胞，室温备用。

6）MS 柱或者 LS 柱安装于磁铁架上，用 1ml PBS（含 1%人血清，2mmol/L EDTA)预洗柱子 3 次，然后将上述细胞悬液加入柱子中，收集流出液，再加入柱子中，以 1ml PBS（含 2mmol/L EDTA）洗涤柱子 10 次。

7）取下分离柱，用 3ml PBS（含 1%人血清、2mmol/L EDTA）冲洗下磁珠结合的细胞，反复 3 次，300*g* 离心 5min，以适量 T 细胞培养基重悬细胞，置于 4℃备用。

8）细胞计数，并以流式细胞仪分析磁珠分离的效果。

注意事项

1）因为 NKT 细胞的比例较低，实际分离时要根据用量，适当调整 PBMC 的用量。

2）磁珠分离后要进行流式细胞仪分析，以确定 NKT 在分离后的纯度，对确定之后 NKT 实验的成功与否非常必要，如果想得到纯度更高的 NKT（如 NKT 细胞纯度要达到 98%以上)，需要采用流式分选的方法。

（二）人 NKT 细胞的流式分选

人的 NKT 细胞 TCRα 链多由 *Vα24-JαQ* 基因重排序列编码，β 链由 *Vβ11* 基因重排

序列编码。用抗 Vα24 单抗标记细胞，流式分析并分选出 $V\alpha24^+$ 的细胞即为 NKT 细胞，为了流式分析时使 NKT 细胞群显得更为清晰，可以用抗 Vβ11 单抗或者抗 6B11 单抗（抗 TCRα 单抗）与抗 Vα24 单抗联合标记，流式分析与分选将更为精确。流式分选人 NKT 细胞方法简便，能够保证明确地得到纯净的 NKT 细胞，特别在 NKT 克隆培养中具有较高利用价值；缺点是需要专业的高速流式细胞分选仪，另外人外周血中 NKT 含量少，分选较为耗时，可与磁珠分选法联合应用，以提高效率。

材料与试剂

人外周抗凝血或者浓缩白细胞

Ficoll-Hypaque 密度梯度分离液

PBS（含 2mmol/L EDTA 及 1%人血清，或只含 2mmol/L EDTA）

荧光抗体标记的抗 Vα24 单抗

T 细胞培养基（RPMI-1640 含 10% FBS，15mmol/L HEPES，1∶100 非必需氨基酸，1∶100 必需氨基酸，4mmol/L 谷氨酰胺，55μmol/L 2-巯基乙醇）

步骤

1）如以上磁珠分离法步骤 1）和步骤 2）分离得到人 PBMC，以 PBS（含 1%人血清、2mmol/L EDTA）悬浮细胞至 10^8 个/ml，置于 1.5ml 离心管中 4℃备用。

2）取少量细胞（约 1×10^5 个），加入荧光抗体标记的同型对照抗体（终浓度 10μg/ml）作为对照，其余细胞加入相同荧光抗体标记的抗 Vα24 单抗（终浓度 10μg/ml），4℃孵育 30min。

3）流式分析并选定 $V\alpha24^+$ 细胞群，用高速流式细胞分选仪分选。

4）以 T 细胞培养基 300g 离心 5min 洗涤 1 次，放置于 4℃备用。

注意事项

1）可用抗 Vβ11 单抗或抗 6B11 单抗和抗 Vα24 单抗双标记细胞，能够更精确地选定 NKT 细胞群。但是如果流式分选要求得到高度纯化的细胞（如大于 98%），就不能单独应用抗 6B11 单抗来分选细胞，因为抗 6B11 单抗也能非特异地结合单个核细胞。

2）因为 NKT 的含量低（<1%），为了避免血小板对流式分选 NKT 细胞的得率和纯度造成太大影响，用 Ficoll-Hypaque 密度梯度法离心得到的 PBMC 要充分洗涤，尽量将血小板去除干净（使离心后上清澄清）。

3）为了提高细胞活力，应直接将目标细胞分选到 T 细胞培养基中。

4）如果一次需要高度纯化的细胞太多，为了避免长时间流式分选造成细胞活力损害和降低长时间流式分选的劳动强度，应该将人 PBMC 细胞先用磁珠分离的方法预先纯化，这时磁珠分离要采用带荧光标记的抗 Vα24 或者抗 6B11 抗体，磁珠分离后可以直接再进行流式分选。

5）流式分选后要将得到的细胞进行流式分析，判断 NKT 细胞的纯度。但是如果以 CD4、CD8、CD56、CD161 作为标志鉴定获得的 NKT，健康人得到的 NKT 中约 75%为 $CD161^+$，约 50%为 $CD4^+$，小部分为 $CD4^-CD8^-$，极少部分为

CD8⁺（小鼠中无 CD8⁺ NKT 的报道）。

（三）人 NKT 细胞的扩增

在 APC 存在的情况下，α-半乳糖神经鞘胺醇（α-GalCer）可以与 CD1 分子相结合，借由 NKT 细胞的 TCR 受体转导信号，特异地刺激 NKT 细胞增殖，在样本量少的实验中，如只能得到几毫升外周血时，体外扩增 NKT 细胞将对实验起到极大的辅助作用。

材料与试剂

分离纯化得到的 NKT 细胞
收集的非 NKT 细胞，或者直接用 PBMC 细胞照射后作为饲养细胞
T 细胞培养基（RPMI-1640 含 10% FBS、15mmol/L HEPES、1∶100 非必需氨基酸、1∶100 必需氨基酸、4mmol/L 谷氨酰胺、55μmol/L 2-巯基乙醇）
圆底 96 孔板
α-GalCer
重组的人 IL-2
冻存液：DMSO∶FCS（体积比）为 1∶10

步骤

1）饲养细胞的制备：以磁珠分离或者流式分选分离 NKT 时，收集非 NKT 细胞（即阴性分选的细胞），或者直接用 PBMC 细胞，以 T 细胞培养基洗涤后，用 ^{60}Co放射源 γ 射线照射（3000～5000rad）灭活，作为饲养细胞，铺 96 孔板（圆底每孔<10^4 个细胞；平底每孔<10^5 个细胞）。
2）将纯化得到的 NKT 细胞以 T 细胞培养基悬浮，与饲养细胞以 1∶1 的比例铺入上述 96 孔板孔中，加入 α-GalCer（20ng/孔），补充 T 细胞培养基至 200μl/孔，在 37℃，5% CO_2 下培养 2d。
3）第 2 天无须换液，加入人 IL-2 100U/ml，继续培养 2 周，镜下观察会有圆形、个大的母细胞形成集落。
4）小心地吸掉 150μl 培养基/孔，补充含有 100U/ml IL-2 的 T 细胞培养基，每隔 2～3d 换液一次，待母细胞逐渐铺满底部，以 1∶2 传代到新的 96 板孔中，或者将生长旺盛的细胞传代到 24 孔板孔中，继续传代培养几周。传代过程中，要将生长旺盛的传代细胞 IL-2 的浓度逐渐减量，从 100U/ml 到 50U/ml、20U/ml，最后维持在 10U/ml 的水平。
5）当细胞增殖变慢或者停止时（静息细胞）可以用于功能试验。如果要冻存扩增的 NKT 细胞，则要选择增殖旺盛的细胞，以 DMSO∶FCS（体积比 1∶10）为冻存液，每支冻存管含有 1×10^5～2×10^5 个细胞。

注意事项

1）本法一般用于样本量小的实验，如只能得到几毫升外周血时，如果样本量充足，一般选择直接纯化得到的 NKT 细胞进行实验。
2）如果用冻存的 PBMC 作为饲养细胞，则饲养细胞在放射线照射前要用台盼蓝拒

染法检测活细胞比例，如果活细胞少于40%，应用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法重新分离PBMC，用于作为饲养细胞的PBMC必须充分洗涤（至少3次）再做照射，因为Ficoll-Hypaque对APC及NKT细胞有毒性。

（四）人NKT细胞的克隆与培养

恒定的NKT细胞株与克隆可以经二次刺激获得扩增，可以应用T细胞丝裂原（如PHA或抗CD3抗体），但是如果培养细胞中含有大量的非NKT细胞，则要应用α-GalCer来选择性刺激。此实验体系中需要有大量的APC存在，NKT细胞可以在2周内扩增1000倍。

材料与试剂

T细胞克隆培养基：RPMI-1640，含10%自体血清（体积比）、20U/ml IL-7和20U/ml IL-2 PHA-P（phytohemagglutinin-P，植物血凝素-P）

T细胞克隆培养基：RPMI-1640，含IL-2和IL-7各50U/ml，10%人血清，10mmol/L HEPES分离人PBMC和进行流式分选的其他试剂

步骤

1）饲养细胞：将Ficoll-Hypaque密度梯度离心分离得到的PBMC，部分经T细胞克隆培养基洗涤3次后，照射灭活（5000rad）用于饲养细胞，铺平底96孔板（10^5个/孔），加入PHA-P（终浓度2μg/ml），补充T细胞克隆培养基至100μl。

2）流式分选：参考人NKT细胞流式分选法，用荧光素标记的抗6B11（或者抗Vβ11）单抗和抗Vα24单抗染色PBMC，直接流式分选$V\alpha24^+$ $6B11^+$（或$V\beta11^+$）双阳性细胞至上述96孔板中。

3）克隆出现：1周后，每孔加入T细胞克隆培养基100μl，2周后，阳性孔中会出现一个或多个母细胞克隆（每个克隆>100个细胞，细胞较大，圆形）。

4）传代：生长旺盛的克隆，可以根据情况每2～3d传代一次（用T细胞克隆培养基）。每次传代培养基中增加1/4的异体人血清或者FBS，直至完全取代自体血清。

5）流式验证：用荧光素标记的抗6B11（或者抗Vβ11）单抗和抗Vα24单抗检测这些克隆是否为NKT。

注意事项

1）如果不能取得足够的自体血清，可以从开始即以异体人血清或者FBS替代。

2）最后一步检测鉴定所得到的克隆是否为NKT细胞不可缺少，以确保后续实验的正确性。

3）在克隆培养3～4周后，细胞增殖可能变缓或停止，如果想继续扩增，可以再次以PHA-P（终浓度2μg/ml）或抗CD3刺激进行二次扩增；如果要冻存NKT细胞需要在增殖活跃阶段，以DMSO：FCS（1：10体积比）为冻存液，每支冻存管含有1×10^5～2×10^5个细胞；如果要用这些NKT进行实验，在T细胞克

隆培养基中，这些 NKT 细胞可以继续培养数周。

（五）人 NKT 细胞产生的细胞因子的测定

在 APC 存在的情况下，α-GalCer 可以与 CD1 分子相结合，借由 NKT 细胞的 TCR 受体转导信号，特异地刺激 NKT 细胞迅速分泌一系列的细胞因子，包括 IL-4、IL-10、IL-13、IFN-γ 和 TNF-α。在人和小鼠自身免疫病中，通常存在着 NKT 的缺陷，如Ⅰ型糖尿病中，外周血 NKT 细胞数量降低，IL-4 产生缺失；在中晚期癌症患者，NKT 细胞明显缺失，但是 IL-4/IFN-γ 的比值却明显升高，这些发现表明，NKT 细胞在免疫调节中起着重要作用。此外，测定 NKT 细胞分泌细胞因子的能力可以在一定程度上反映 NKT 细胞的功能状况。

CD1d 是 MHC-Ⅰ类分子样的蛋白质，为非对型性，特异识别脂类抗原。NKT 细胞通过识别 CD1d 并发挥功能，虽然在体内其功能仍有待确证，但是 NKT 细胞通过分泌 IL-4 和 IFN-γ 来调节免疫功能是已经被证明的。通过测定 IL-4 和 IFN-γ 的产生、测定抗原刺激后 CD1d 特异的细胞增殖和细胞溶解作用都能够反映 NKT 细胞的功能状况，在此只对细胞因子产生的测定做一描述。

材料与试剂

经过分离纯化或克隆扩增的 NKT 细胞

T 细胞刺激培养基：为 RPMI-1640 培养基，含 10% FBS、15mmol/L HEPES、10U/ml 人 IL-2

小鼠抗人 CD1d 单抗

α-GalCer 处理过的 APC

细胞因子 ELISA 试剂盒

96 孔平底板

步骤

1）NKT 细胞：以 96 孔平底板培养恒定的 NKT 细胞，$\leqslant 10^5$ 个/孔，以 T 细胞刺激培养基培养。

2）刺激因素：若要评价 NKT 特异识别 CD1d 的效应，可以用等量的 CD1d 转染的细胞（如 C1R）加入体系，加入 PMA（1ng/ml 终浓度）；或者可以在体系中加入等量的 α-GalCer 处理过的 APC，并加入 α-GalCer 100ng/ml。

3）收集细胞培养上清，各种细胞因子的最佳收集时间如下：CD1d 反应性 IL-4 的产生为 1d、IFN-γ 为 3d。

4）用商品化的 ELISA 试剂盒测定细胞因子。

注意事项

1）用于测定细胞因子产生的 NKT 细胞必须已经用 T 细胞刺激培养基静态培养 3d，IL-2 细胞因子的使用量已经降低下来。

2）根据实验的灵敏度，可以适当调整每孔铺设的细胞数量，甚至每孔可以$\leqslant 10^4$个细胞。

3）强烈建议实验时设定最大反应对照孔，可以用丝裂原PHA-P或抗CD3抗体进行，以确定实验是否成功。

4）CD1d阻断实验可以确定α-GalCer刺激的反应是否为CD1d依赖的，加入的CD1d抗体和同型对照抗体应该设置抗体浓度梯度，以便更好地反映这一现象。

5）IFN-γ峰值时间可能不一，需要根据预实验确定时间反应曲线。

6）如果用丝裂原PHA-P（μg/ml）或抗CD3抗体刺激细胞作为最大效应对照组，则IL-4释放峰约为1d，IFN-γ释放峰为1～2d。

二、小鼠NKT细胞的分离与培养

在正常情况下，NKT细胞占小鼠肝脏单个核细胞的10%～20%，小鼠脾细胞的1.5%，小鼠胸腺细胞的0.5%，健康人外周血的0.01%～0.5%。由于小鼠的NKT细胞可以特异性识别由CD1d分子提呈的脂类抗原α-GalCer，所以使用α-GalCer/CD1d二聚体来特异地结合NKT细胞后，能够通过磁珠分离或者流式分选的方法纯化这些NKT细胞。考虑到分离过程中由于离心、洗涤和机械精确度等影响，一般情况下，NKT细胞的得率在脾细胞和胸腺细胞中小于0.5%，在肝脏单个核细胞则小于5%。这两种方法分离得到的细胞纯度可以达到90%以上，尤以流式分选法纯度可达98%以上。实验中考虑到磁珠分离法的速度快，而流式分选法的纯度高等因素，可以将细胞先利用磁珠分离，再用流式分选，但是相应的，细胞的损失率也会更高。我们在此主要就小鼠NKT细胞分离与培养的一般方法做一介绍（Watarai，2008）。

（一）磁珠分离小鼠NKT细胞

材料与试剂

脾脏、肝脏、胸腺细胞悬液
抗小鼠CD16/CD32单抗
PE标记的α-GalCer/小鼠CD1d二聚体
抗PE微磁珠
LS柱
磁铁架

步骤

1）悬浮来自脾脏、肝脏、胸腺等的细胞至 2×10^7 个/ml，用抗小鼠CD16/CD32单抗（1μg / 10^6个细胞）以阻断抗体与FcR非特异性结合。4℃孵育10min。

2）细胞悬液中加入PE标记的α-GalCer/小鼠CD1d二聚体（2μl/10^6个细胞），4℃孵育30min。

3）洗涤细胞2次，4℃下800*g*离心5min，以MACS缓冲液重悬细胞，加入抗PE微磁珠（10μl/10^7个细胞），4℃孵育10min。

4）过LS柱，收集阳选的细胞即为小鼠的NKT细胞。

5）流式检测确定NKT细胞的纯度。

（二）流式分选小鼠的 NKT 细胞

材料与试剂

脾脏、肝脏、胸腺细胞悬液

抗小鼠 CD16/CD32 单抗

APC 标记的 α-GalCer/ CD1d 二聚体，PE 标记的抗 TCRβ 抗体和 FITC 标记的抗 CD19 抗体

RPMI-1640 完全培养基

步骤

1）悬浮来自脾脏、肝脏、胸腺等的细胞至 2×10^{7} 个/ml，用抗小鼠 CD16/CD32 单抗（1μg / 10^{6} 个细胞）以阻断抗体与 FcR 非特异性结合。4℃孵育 10min。

2）加入 APC 标记的 α-GalCer/小鼠 CD1d 二聚体（2μl/10^{6} 个细胞），PE 标记的抗 TCRβ 和 FITC 标记的抗 CD19 抗体[1μl/(10^{7}个细胞 · 0.1ml)，特别是在脾脏细胞，因为存在大量 B 细胞，抗 CD19 抗体标记用于流式分析时圈出 B 细胞]，4℃孵育 30min。

3）洗涤细胞，并重悬为 2×10^{7} 个/ml 的浓度。

4）流式分析并选取 α-GalCer/小鼠 $CD1d^{+}$ $TCR\beta^{+}$ 的 NKT 细胞，分选到有 RPMI-1640 完全培养基的收集管中。

5）收集完毕，以 RPMI-1640 完全培养基洗涤，流式分析所得到细胞的纯度。

（三）小鼠 NKT 细胞的培养

材料与试剂

纯化的 NKT 细胞

重组的小鼠 IL-2、IL-12、IL-7

抗 CD3 单抗或抗 TCR-β 单抗

96 孔及其他培养板

准备抗体包被的培养板：用抗 CD3 单抗（3μg/ml）或抗 TCR-β（3μg/ml）单抗 50μl/孔、150μl/孔 或 250μl/孔分别加入 96 孔板、48 孔板、24 孔板中，常温下放置，在应用前用 1ml/孔的 RPMI-1640 完全培养基洗涤

RPMI-1640 完全培养基（含 10% FBS）

步骤

1）用 RPMI-1640 完全培养基悬浮纯化的 NKT 细胞，加入重组的小鼠 IL-2（10ng/ml）、重组的小鼠 IL-12（1ng/ml）和可溶性的抗 CD28 抗体（1μg/ml），使细胞浓度为 2×10^{5} 个/200μl。

2）将细胞在包埋了抗 CD3 单抗或抗 TCRβ 单抗的平底 96 孔板中，在 5% CO_2 环境下培养 2d。

3）将细胞转移到未包被的培养板中，以RPMI-1640完全培养基，在5% CO_2下培养2d。

4）收集细胞，以RPMI-1640完全培养基重悬，加入2U/ml的IL-7，在5% CO_2条件下培养4d。

5）收集细胞，以RPMI-1640完全培养基重悬，用包被有抗CD3单抗或抗TCRβ单抗的培养板中培养3d。

6）重复步骤4）和5）。

7）在5% CO_2条件下培养细胞到19～21d，分析检查细胞。

注意事项

1）使用α-GalCer长时间活化NKT细胞容易引起小鼠NKT细胞的凋亡，因而α-GalCer不能用于准备大量的小鼠NKT细胞的扩增培养实验。

2）在NKT细胞分选时，可以用流式分选的方法将细胞直接分选到培养板中，这样可以减少中间操作步骤，提高细胞的活力，但每孔细胞不能太多，避免鞘液混入过多而稀释了培养基。

3）步骤4）和5），应该根据细胞的量，选用合适孔径的细胞培养板。

（张明刚）

参考文献

沈关心，周汝麟. 2002. 现代免疫学实验技术. 第二版. 武汉：湖北科学技术出版社. 407～411.

Di Santo JP. 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. Annu Rev Immunol, 24:257～286.

Hayakawa Y, Huntington ND, Nutt SL, et al. 2006. Functional subsets of mouse natural killer cells. Immunol Rev, 214: 47～55.

Karlhofer FM, Yokoyama WM. 1991. Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. J Immunol, 146:3662～3673.

Lanier LL. 2005. NK cell recognition. Annu Rev Immunol, 23:225～274.

Lanier LL. 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. Nat Immunol, 9:495～502.

Long EO. 2008. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. Immunol Rev, 224:70～84.

Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. Annu Rev Immunol, 19:197～223.

Raulet DH, Vance RE, Mc Mahon CW. 2001. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. Annu Rev Immunol, 19:291～330.

Watarai H, Nakagawa R, Omori-Miyake M, et al. 2008. Methods for detection, isolation and culture of mouse and human invariant NKT cells. Nat Protoc, 3(1):70～78.

Yokoyama WM, Plougastel BF. 2003. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. Nat Rev Immunol, 3:304～316.

Zhang M, Han Y, Han C, et al. 2009. The beta2 integrin CD11b attenuates polyinosinic:polycytidylic acid-induced hepatitis by negatively regulating natural killer cell functions. Hepatology, 50: 1606～1616.

第四章　T 淋巴细胞

第一节　引　　言

作为细胞免疫重要的介导细胞，T 淋巴细胞在机体对抗外来抗原与病原体入侵过程中发挥着重要作用。T 淋巴细胞主要由 $CD4^+$ T 细胞与 $CD8^+$ T 细胞组成。$CD4^+$ T 细胞又被称为辅助性 $CD4^+$ T 细胞（helper $CD4^+$ T cell，Th 细胞），其识别抗原受 MHC-Ⅱ类分子限制，在功能上可辅助 B 细胞产生抗体，辅助 $CD8^+$ T 细胞免疫应答，以及通过分泌各种细胞因子从而发挥免疫调控功能。根据功能与细胞因子分泌情况，$CD4^+$ T 细胞可分为 Th1、Th2、Th17、调节性 T 细胞（regulatory T cell，Treg）与滤泡状 Th 细胞（follicular helper T cell，Tfh 细胞）。Th1 细胞分泌 IFN-γ，可调控机体对细胞内病原体抗原的提呈与免疫应答，而 Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 与 IL-13，介导体液免疫与针对寄生虫的免疫应答。近年来发现的 Th17 细胞可产生 IL-17A、IL-17F 与 IL-22，可调控组织细胞的炎症反应，在自身免疫性疾病中发挥重要的作用。最近研究人员发现一群依赖于 IL-21、IL-6 与转录因子 Bcl-6 而产生的表达 CXCR5 与 ICOS 的滤泡状 Th 细胞，在体液免疫中辅助 B 细胞产生抗体中发挥着重要的作用。另外，调节性 $CD4^+$ T 细胞因其对免疫应答的重要调控功能及其在自身免疫性疾病、移植排斥等各种疾病中的重要作用，也成为一大研究热点。$CD8^+$ T 细胞通常又被称为细胞毒 $CD8^+$ T 细胞（cytotoxic $CD8^+$ T cell，CTL），因其具有细胞毒杀伤功能而得名，其识别抗原受 MHC-Ⅰ类分子限制，在功能上可杀伤病毒或细菌感染的靶细胞以及肿瘤细胞，是介导细胞免疫的重要效应 T 细胞。此外，$CD8^+$ T 细胞也存在可分泌 IL-10、TGF-β 等细胞因子且可抑制免疫应答的亚群，称为抑制性 $CD8^+$ T 细胞（suppressor $CD8^+$ T cell，$CD8^+$ Ts 细胞）。

一个完整的 T 细胞免疫应答，不论对于 $CD4^+$ T 或 $CD8^+$ T 细胞来讲，均可人为地大致分为 4 个期：活化期、扩增期、收缩期与记忆形成期。初始 T 细胞通过识别抗原提呈细胞以 MHC-Ⅰ类或 MHC-Ⅱ类分子限制性提呈的抗原后活化，T 细胞在活化后可出现迅速增殖与大量扩增，并分化成各种效应 T 细胞，在抗原清除后 T 细胞免疫应答进入收缩期，其中大部分效应 T 细胞将出现凋亡，只有少部分 T 细胞可转变成记忆性 T 细胞，这些记忆性 T 细胞可在机体再次遇到相应抗原时迅速启动再次免疫应答从而清除抗原入侵。T 细胞免疫应答在机体对抗细菌、病毒与真菌等各种病原体的入侵发挥重要的作用，在机体抗肿瘤免疫中也发挥了重要的作用，另外，T 细胞免疫应答的调控也对自身免疫性疾病与移植排斥的机制研究与防治具有重要的意义。因此研究 T 淋巴细胞及其相关的免疫应答具有重要的现实意义，围绕 T 淋巴细胞研究的技术方法的介

绍也显得很有必要。

本章将重点介绍 T 淋巴细胞的分离、亚群分离与诱导培养，以及包括增殖与杀伤等在内的功能研究的体外与体内研究方法，介绍 T 细胞克隆与 T 细胞杂交瘤建立的方法，并将介绍在免疫记忆中发挥重要作用的记忆性 T 细胞研究的技术方法。

第二节　T 细胞分离

T 细胞的形成依赖于胸腺，所以被称为胸腺依赖细胞，简称 T 细胞。目前认为，在人体胚胎期和初生期，骨髓中的一部分多能干细胞或前 T 细胞迁移到胸腺内，在其内诱导分化成熟，成为具有免疫活性的 T 细胞。成熟的 T 细胞经血流分布至外周免疫器官的胸腺依赖区定居，并可经淋巴管、外周血和组织液等进行再循环，发挥细胞免疫及免疫调节等功能。T 细胞的再循环有利于广泛接触进入体内的抗原物质，加强免疫应答，较长期保持免疫记忆。

T 细胞是淋巴细胞的主要组分，它具有多种生物学功能，如直接杀伤靶细胞、辅助或抑制 B 细胞产生抗体、对特异性抗原和促有丝分裂原的应答反应，以及产生细胞因子等，是身体中抵抗疾病感染、肿瘤形成的重要防线。因此对于 T 细胞及其亚群的深入了解有着重大意义，它能够帮助我们更好地理解机体的免疫系统是如何运作的，从而更好地帮助我们抵御各种疾病的困扰，维护机体健康。而 T 细胞的分离是对其研究最基本的前提。

T 细胞根据表面是否表达 CD4 和 CD8 还可以进一步分为 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞，本章将先介绍总的 T 细胞分离方法，随后介绍各亚群的分离。

一、尼龙棉柱分离法

B 细胞易黏附于尼龙棉（聚酰胺纤维）表面，而 T 细胞则不具此能力，借此可将 T 细胞与 B 细胞分离。经过处理的尼龙棉均匀充填聚乙烯塑料管，将淋巴细胞悬液加入柱内，孵育。用洗脱液洗脱，流出液内含有 T 细胞。重复灌洗几次除去管内残留的 T 细胞，再用洗脱液边洗边挤压塑料管，还可得到 B 细胞。

本法是实验室常用的分离方法之一，操作简便、易行，不需特殊仪器，淋巴细胞活性不受影响。所获 T 细胞纯度可达 90%，B 细胞纯度可达 80%。缺点是尼龙棉可能选择性滞留某些 T 细胞亚群，可能存在其他细胞的污染。而且只能够分离总的 T 细胞，不能分离特异性 T 细胞亚群，现在使用较少。

材料与试剂

尼龙棉柱

半透明的聚乙烯塑料软管

50ml 注射器

尼龙棉（聚酰胺纤维）

淋巴细胞悬液

CO_2 细胞培养箱

步骤

1. 尼龙棉的清洗与干燥

1）将尼龙棉放入烧杯中，加入蒸馏水或去离子水，用铝箔盖上烧杯并煮沸约 10min。

2）冷却至常温，倒入漏斗内，使水滴干。

3）重复步骤 1）和 2）数次。

4）将尼龙棉摊在铺有纱布的方盒内，37℃温箱干燥 2～3d 后，干燥贮藏。

2. 装尼龙棉柱

1）取 50ml 玻璃注射器，拔去注射芯，在注射器头上套一段软管。

2）将尼龙棉细致撕匀，填入注射器内，约 20ml 的体积。

3）将填好尼龙棉的注射器连同注射器芯一起包好，高压灭菌。

3. 细胞分离

1）将注射器固定在支架上，倒入 37℃的细胞培养液，夹闭软管一定时间，然后打开，放掉细胞培养液，以清洗几次尼龙棉。

2）将要分离的细胞液用预先加温的培养液稀释成适当的浓度，约 5.0×10^{7} 个/ml。

3）将细胞液倒入注射器内，使之没过尼龙棉柱。盖上注射器，37℃温育 45min 至 1h。

4）打开下口，缓慢放流（1 滴/min），收集于离心管中。

5）离心，即获所需的 T 淋巴细胞。

6）关闭注射器下口，于注射器内加入 0.85%冰冷生理盐水，振荡，并套上注射器芯，打开下口，使劲推出注射器内液体，即获得黏附于尼龙棉上的 B 淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞等。

注意事项

1）此种分离法，T 淋巴细胞也常有一部分被吸附，吸附的多少与尼龙棉的质量有关，与装柱的松紧也有关系。

2）此法的 T 淋巴细胞的回收率为 20%～30%，细胞纯度可达 90%以上，且活性不受影响。

3）用过的尼龙棉可回收，以盐水洗涤，然后浸入 0.1mol/L 的 HCl 中过夜，然后再同前法清洗。

二、E 花环分离法

成熟的 T 细胞表面表达绵羊红细胞（SRBC）受体，即 E 受体（CD2）。T 细胞能与 SRBC 结合形成 E 花环，而 B 细胞则不能。经 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液密度梯度离心，E 花环形成细胞因密度增大而沉积于管底。用低渗法裂解花环中的 SRBC，即可获得纯化的 T 细胞。悬浮在分层液界面的细胞群则富含 B 细胞。采用 2-氨乙基异硫脲

溴化物（2-amino ethyl-isothiouronium bromide，AET）或者神经氨酸酶（neuraminidase，NM）处理SRBC后，可增强E花环形成效果和稳定性，从而提高T细胞分离效率。淋巴细胞与用AET处理的绵羊红细胞（SRBC）混合后，其中全部T淋巴细胞均能吸附AET-SRBC，形成牢固稳定而巨大的E花环，较正常未处理的SRBC形成的E花环百分比高，而且形成快速，不易脱落，重复性好。再经淋巴细胞分层液分离时，AET-E花环易沉于管底。但因为磁珠分选和流式细胞仪等更加高效的分选方法的出现，这种方法现今也较少使用。

材料与试剂

AET溶液

SRBC

Tris-NH_4Cl缓冲液

等渗生理盐水等

Ficoll-Hypaque分层液

阿氏液（Alsever's solution）

步骤

1）从新鲜血液分离单个核细胞。

2）AET液配制：称取AET粉剂402mg，溶于10ml去离子水中，用4mol/L NaOH溶液9或10滴，调至pH9.0，用0.2μm滤膜过滤除菌。用前临时配制。

3）SRBC悬液配制：无菌取保存于Alsever液中的SRBC 5ml，加20倍体积的无菌等渗盐溶液，1800r/min离心5min，连续洗涤5次。洗涤后的SRBC在用AET处理前可保存2～3d。尽可能去除其中的淋巴细胞。

4）AET-SRBC的制备：取2ml SRBC，充分混匀，使SRBC完全分散，加入8ml新鲜配制的pH9.0的AET溶液（1∶4），置37℃水浴15min，每隔5min摇匀1次。加入预冷的无菌等渗盐溶液至离心管口1～2cm处，1800r/min离心5min，连续洗涤5次，每洗1次，必须充分摇匀，以减少AET使SRBC黏附成团，并观察有无溶血。如有溶血现象，则用含小牛血清的RPMI-1640再洗1次，最后配成10% AET-SRBC悬液，置4℃保存，不得超过5d。使用时用10%小牛血清的RPMI-1640培养液稀释至1%。

5）AET-E花环实验：将分离的单个核细胞（2×10^6个/ml）与等量1% AET-SRBC混合，置37℃水浴15min，每5min摇匀1次，然后分数管，每管2～3ml，低速1000r/min离心5min后，移至4℃冰箱45min。

6）T淋巴细胞和B细胞的分离：将形成E花环的细胞悬液，再用聚蔗糖-泛影葡胺分层液分离，吸取界面云雾状的细胞层，即为富含非T淋巴细胞群（富含B细胞）。取沉淀于管底的E花环，用Hank's液洗1次后，加双蒸水3ml处理3s，低渗裂解E花环周围SRBC，立即加3.5%NaCl溶液1ml，使还原为等渗，低速离心沉淀，即得富含T淋巴细胞群。

注意事项

1）影响E花环试验最主要的因素是淋巴细胞和红细胞的新鲜程度，待分离的血样必须新鲜、无菌，采血后要求在3～4h内进行检验，否则由于淋巴细胞的死亡，受体脱落，影响分离结果。红细胞用阿氏液保存最多不要超过3周，且不应溶血。

2）反应温度、时间等条件对花环形成率有较大影响。选37℃作用10min，低速离心5min，置4℃ 2～4h，其结果稳定性较好，结合率较高。如在37℃作用时间较长，可见花环发生变形，结合部位松弛、拉开，甚至解离。

3）牛血清能增加花环形成细胞的稳定性，增强与指示红细胞结合的牢固性。

4）所用溶液pH以7.2～7.4为宜，温度在30℃以上或10℃以下可影响E花环形成，最适温度为（23±2）℃。

5）SRBC与E受体结合可以激活某些T细胞，导致其功能增强。

三、微量细胞毒法

补体介导淋巴细胞毒试验（complement dependent cytotoxicity，CDC）通常是在器官移植时，检测受者血清是否存在直接针对供者HLA抗原的抗体，以此来确保同种异体移植不发生超急性或急性排斥。CDC的原理是：被检血清中的抗体与供者淋巴细胞膜表面相应抗原结合后激活补体，引起细胞膜破损，这种抗体称细胞毒抗体。如将含有此抗体的血清与淋巴细胞和补体共同孵育，淋巴细胞将被破坏，细胞膜通透性增加，染料得以渗入使细胞着色。根据着色的死细胞数目，可以估计淋巴细胞毒的强度。然而此原理也可用于细胞亚群的分离。

利用特异性抗体结合细胞表面抗原后，在补体作用下使被抗体结合的细胞溶解破坏，从而去掉相应细胞达到分离细胞的目的。如欲分离T细胞，可先分离淋巴细胞，将抗CD20的抗体和新鲜兔血清加入细胞悬液中，37℃ 温育30min。抗CD20的抗体与B细胞结合，在补体作用下B细胞被溶解破坏，洗涤细胞悬液即可获得T淋巴细胞。本方法只适合阴性分离法。现以用抗CD4抗体从总T细胞中分离$CD8^+$ T细胞为例。

材料与试剂

Ficoll-Hypaque细胞分层液

Hank's液（内含5%小牛血清和1.0g/L叠氮钠）

新生家兔补体

肝素

抗CD4单克隆抗体（必须是可以和补体结合的IgG2a或者IgM）

总T细胞

步骤

1）检测新生家兔补体的非特异性毒作用。确定能够产生最大抗体介导的细胞毒效应和最小的非特异性细胞毒性所需的补体浓度（通常为20%～50%）。

2）确定标记单个核细胞所需抗体量，流式细胞仪检测验证。

3）取 1ml 总 T 细胞悬液与适量的抗 CD4 单克隆抗体反应，4℃孵育 30min。
4）用 Hank's 液洗 2 次，1000r/min 离心 5min，去除游离抗体。
5）加入新鲜的适量的兔补体反应，37℃ 水浴 1h。
6）1000r/min 离心 10min，弃上清。
7）用 Hank's 液洗 2 次。
8）用聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心去除死细胞，死细胞沉于管底。收集聚蔗糖-泛影葡胺层上方细胞，获得 $CD8^+$ T 细胞，储存于 4℃备用。

注意事项

1）采血后，应在 2h 内进行试验，且需在 4℃中分离细胞，以保持细胞活力。
2）抗体对于杀死靶细胞有个最适合的浓度，而且每次制备的兔新鲜血清效价并不一致，所以每次分离前均需经过预试验确定抗体和补体的稀释倍数。
3）实验中应设以下对照：只加抗体而不加补体，只加补体而不加抗体，以及用完全培养基重悬不加抗体及补体的细胞，可测定抗体或者补体的非特异性细胞毒作用。
4）步骤 4）中，如有需要，可取出部分细胞悬液检查，以确定细胞毒作用的效果。必要时再加入适量的抗体与补体孵育，以提高细胞毒作用效果。
5）最后收集到的细胞中会残留少量 $CD4^+$ T 细胞以及 CD8 阴性细胞。用该法分离的 T 细胞亚群活力可达到 95%以上，纯度在 80%以上。
6）同法可用抗 CD8 单抗代替 CD4 单抗，可获得 $CD4^+$ 细胞。

四、磁珠分选法

磁性微珠在液相中，受外加磁场的吸引作用，可吸附在磁性介质上。以磁性微珠为载体，包被上针对某种细胞表面抗原的特异性抗体即可制成免疫磁性微珠。免疫磁珠分离法的原理是将抗特异细胞表面抗原的抗体结合到磁珠上，形成免疫磁珠。与混合体系中的细胞反应后，利用磁力的作用，使与磁珠结合的细胞与其他细胞分离，达到纯化、分离的目的。阳性分离 T 细胞常用到的抗体免疫磁珠主要有 CD3、CD4、CD8、CD25 等。

磁珠分离法的分离效果与流式细胞仪的细胞分离效果相媲美，并具有比流式细胞仪分离技术经济、省事节时、操作简单、快速等优点，因此在实验中得到广泛的应用。

材料与试剂

磁性激活细胞分离柱（MACS）：LS 柱
CD4 标记的磁性微珠
MACS 缓冲液
30μm 滤网
淋巴细胞悬液
RPMI-1640 细胞培养液

步骤

此处以直接标记法手动分离 $CD4^+$ T 淋巴细胞为例

1）MACS 柱的准备：MACS 柱需高压灭菌，60℃烘干后备用。使用前（至少 2h

前）应准备完毕。

2）将人 PBMC 悬液或淋巴细胞悬液（含 10^8 个细胞）离心，重新悬浮于 0.9ml MACS 缓冲液中，加入 CD4 单抗磁珠 100μl，冰浴孵育 15min。用 MACS 缓冲液洗涤 2 次后（1500r/min 离心 5min），重新悬浮，加入 1ml MACS 缓冲液。

3）将 MACS 柱放入 MACS 磁铁槽内，用 3ml MACS 柱洗脱液洗柱。在柱下放一支 15ml 的离心管。用不含气体的 MACS 缓冲液冲洗分选柱 3 次，每次 3ml。弃去洗脱液，在分选柱下方放置一支干净的无菌离心管。

4）将标记好抗体磁珠的细胞悬液通过 30μm 的滤网，并用 0.1～0.4ml MACS 缓冲液冲洗滤网后，将细胞悬液上样到 LS 分选柱上。

5）用 MACS 缓冲液每次 3ml 冲洗分离柱 3 次。如果需要，可将洗脱液作为阴性细胞保存。

6）将 MACS 柱移出磁场外，放在一个干净无菌的 15ml 离心管上。在分离柱中加入 5ml MACS 缓冲液。将活塞塞进分离柱并洗脱阳性细胞。

7）细胞悬液离心后重悬浮，调整到一定浓度，4℃保存备用。

注意事项

1）MACS 柱用毕后需立即用 PBS 冲洗干净，再以 10 倍于柱体积的无菌双蒸水和 5 倍于柱体积的 100%乙醇溶液洗涤，37℃下烘干，浸泡在 100%乙醇中备用。

2）有各种不同容量的 MACS 柱，可根据需要选择。

3）不要将组织块或大细胞团块加入柱内，以免造成堵塞进而毁坏 MACS 柱。

4）在 MACS 柱上加入液体时不要产生气泡。

5）如果分选的细胞还需要进行培养，所有的器材和液体均应无菌。MACS 分离过程应在超净工作台内完成。

6）用作细胞功能实验时，最好用免疫磁性微珠阴性分离细胞，因为这些细胞未发生抗原抗体反应而基本处于正常状态；而免疫磁性微珠阳性分离细胞，由于发生抗原抗体结合反应，可能导致细胞活化或凋亡，从而使细胞处于非正常状态，影响到细胞的功能。

五、流式分选法

流式细胞仪进行细胞分选是常用的细胞分选方法之一，其原理是在对细胞进行各种荧光的分析测定之后，使液体流束形成含有细胞的带电液滴，这些液滴通过恒定的电场时就能对细胞进行分选。简要来说，安装在分选仪喷嘴上的超声振荡装置能发生每秒钟 4 万次以上的高频振荡，将由喷嘴出来的液体流束破碎成每秒上万个小水滴，而待测细胞就被分散在这些小液滴之中。通过脉冲信号使得这些小液滴带上不同的电荷或者不带电，当这些细胞滴流经一对带有几千伏恒定静电场的偏转板时，液滴将根据自身所带的电荷性质发生偏转，进入两侧的收集管中，而不带电荷的水滴则径直落入废液收集管中，从而实现对细胞的分选。常用的 T 细胞的 FACS 分选抗体有 CD3、CD4、CD8、CD25、CD44、CD62L、CD45RB 等。

与 MACS 相比，FACS 有着以下优点：稀有细胞分选时比 MACS 精确得多；可以

多个标记分选、阳选阴选同时进行，而MACS一般只能对单个标记进行阳选或者多个标记的阴选。但是FACS需要大型设备，不适合大多数实验室工作条件，而且操作复杂，需要专门的有经验的操作人员。具体参见第二十五章流式细胞术。

第三节　T细胞亚群的分离与培养

T细胞亚群主要包括$CD4^+$ T细胞亚群与$CD8^+$ T细胞亚群。

$CD4^+$T细胞，又称辅助性T细胞（Th），在初始状态下未接受免疫或感染下为Th0细胞，在各种不同的活化条件下可分化为各种Th细胞，包括Th1、Th2、Th17与Tfh，同时也可产生诱导型调节性T细胞（inducible regulatory T cell，iTreg）。在本节中将重点介绍小鼠抗原特异性的Th1、Th2与Th17的分离与诱导培养。关于Treg的分离与诱导培养将在本章第九节中介绍。

$CD8^+$ T细胞的亚群主要为细胞毒$CD8^+$ T细胞（CTL），其诱导可分为抗原特异性CTL和不考虑抗原特异性的总CTL两种方案，本节中主要介绍抗原特异性CTL的诱导。

一、$CD4^+$ T细胞及其亚群的分离培养

（一）Th1与Th2细胞的诱导培养

为了诱导Th1与Th2细胞的分化，首先需要采用非特异性或特异性活化的方式使初始$CD4^+$ T细胞（即Th0细胞）活化。非特异性Th细胞反应常采用包被的抗CD3/抗CD28诱导，或者在抗原提呈细胞的辅助下采用可溶性抗CD3抗体进行诱导。而抗原特异性Th细胞反应常见的类型有两种，一种是以同种异型细胞作为抗原诱导的同种异型反应性T淋巴细胞反应，另一种则为可溶性抗原在同型的抗原提呈细胞的提呈下诱导的TCR转基因小鼠来源$CD4^+$ T淋巴细胞反应。为了获得不同细胞因子分泌特点与功能特征的Th细胞，一般可在诱导Th细胞反应时加入外源性细胞因子与联合应用细胞因子阻断性抗体以使Th0细胞向特定的方向分化。简言之，Th1的诱导需要加入IFN-γ、IL-12与抗IL-4，而Th2的诱导需要加入IL-4、抗IFN-γ与抗IL-12。在相应的培养条件下诱导4d以上即可培养出相应的Th1或Th2细胞。为了鉴定Th1或Th2细胞是否已被成功诱导，可以采用的方法主要有两种：第一，采用诱导时的活化方式对细胞进行再刺激，一段时间后（一般为24h）检测上清中Th1与Th2相关的细胞因子（即Th1为IL-2与IFN-γ，Th2为IL-4、IL-5与IL-13）；第二，采用T细胞非特异性活化剂佛波酯（PMA）联合离子霉素（ionomycin）再刺激细胞4h，通过胞内染色检测细胞内各种相关细胞因子的表达情况。

本方法以可溶性抗CD3抗体联合抗原提呈细胞诱导非特异性$CD4^+$ T淋巴细胞反应而产生Th1与Th2为例进行介绍。本方法的优点是可获得大量定向分化的Th1或Th2细胞，可以满足相关的实验需求；缺点是诱导需要加入多种细胞因子与阻断性抗体，费用比较高。

材料与试剂

C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）

抗 CD3

rmIL-12（Pepro Tech 或 R&D Systems）

rmIL-4（Pepro Tech 或 R&D Systems）

抗 IL-4（Clone 11B11）

抗 IL-12

抗 IFN-γ（Clone XMG1. 2）

PMA 与 ionomycin（Sigma）

Brefeldin A（Sigma）

96 孔圆底培养板

流式细胞仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤

1）Th0 细胞的制备：取 C57BL/6J 小鼠脾脏并制备成单细胞悬液，采用磁珠分选 CD4 阳性细胞（有条件的实验室可采用流式分选 $CD4^{+}$ $CD25^{-}$ $CD44^{low}$ $CD62L^{high}$初始 T 细胞），获得 Th0 细胞后采用含 10%FBS 的 RPMI-1640 调整 Th0 细胞浓度为 2×10^{6} 个/ml，在 96 孔圆底板每孔中加入 50μl 的 Th0 细胞（1×10^{5} 个），每组设 3 个复孔。

2）抗原提呈细胞的制备：可选用的抗原提呈细胞主要有两种，即经射线照射或采用丝裂霉素 C 处理过的且剔除 T 细胞的 C57BL/6J 小鼠脾脏细胞悬液，或者经培养的 C57BL/6J 小鼠骨髓来源成熟树突状细胞。若为前者，则将抗原提呈细胞的浓度调为 2×10^{6} 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入 50μl 的抗原提呈细胞（抗原提呈细胞：Th0 细胞的比例为 1∶1）。若为后者，则将抗原提呈细胞的浓度调为 2×10^{5} 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入 50μl 的抗原提呈细胞（抗原提呈细胞：Th0 细胞的比例为 1∶10）。同时设置 Th0 细胞与抗原提呈细胞单独培养的对照组各 3 个复孔。

3）加入浓度为 4μg/ml 的抗 CD3 可溶性抗体 50μl（终浓度为 1μg/ml）。

4）诱导 Th1 时：加入终浓度为 10ng/ml 的 IL-12 与终浓度为 10μg/ml 的抗 IL-4。

5）诱导 Th2 时：加入终浓度为 10ng/ml 的 IL-4、终浓度为 10μg/ml 的抗 IFN-γ 与终浓度为 10μg/ml 的抗 IL-12。

6）采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 将各孔总体积均补至 200μl，混匀后将 96 孔板置于 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养 4d。

7）培养 4d 后收集分化的 Th1 或 Th2 细胞，鉴定相应的细胞因子分泌情况。常用的方法有两种：①将分化的细胞采用诱导时相同的活化条件（抗 CD3/抗原提呈细胞）活化 24h 后收集上清，ELISA 检测上清中的各种细胞因子的水平；②采用细胞因子胞内染色法检测细胞内细胞因子的分泌情况，即将细胞采用 5ng/ml PMA 与 500ng/ml 的 ionomycin 并在 10μg/ml Brefeldin A 存在的条件

下再刺激4h，然后采用荧光标记的抗细胞因子抗体进行胞内标记以及流式上样与分析。

注意事项

1）各种细胞因子与阻断性抗体的活性应确保正常，因此需保存于−20℃或−80℃，并应避免反复冻融，因为任何一个试剂出了问题将会直接影响Th细胞的分化方向与分化效率。

2）Th1的鉴定一般检测IL-2与IFN-γ的情况，而Th2的鉴定则检测IL-4、IL-5与IL-13的分泌情况。

（二）Th17细胞的诱导培养

近年来Th17已经成为一个新的研究热点，尽管在各个实验室其诱导方法略有不同，但总体的原则是一致的，即抑制Th1与Th2的分化同时诱导Th0向Th17方向分化。一般来讲，Th17的诱导需要加入TGF-β1、IL-6、抗IFN-γ与抗IL-4。另外，其他一些对Th17的分化发育与功能具有重要作用的细胞因子也可在Th17的诱导中被加入，如IL-23与IL-21。

Th17的诱导同Th1与Th2的诱导一样，也需要将Th0进行活化，且活化的方式也基本相同。因此，本方法也采用可溶性抗CD3抗体联合抗原提呈细胞来诱导非特异性$CD4^+$ T淋巴细胞反应，并在诱导过程中加入相应的条件促进Th17的分化。

材料与试剂

C57小鼠（雌性，6～8周龄，SPF级别）
抗CD3
rhTGF-β1（R&D Systems）
rmIL-6（R&D Systems）
抗IL-4（Clone 11B11）
抗IFN-γ（Clone XMG1.2）
PMA与ionomycin（Sigma）
Brefeldin A（Sigma）
96孔圆底培养板
流式细胞仪（BD Bioscience公司的Calibur或LRS Ⅱ）

步骤

1）Th0细胞的制备：同Th1与Th2细胞的诱导培养中的方法。

2）抗原提呈细胞的制备：同Th1与Th2细胞的诱导培养中的方法。

3）加入浓度为4μg/ml的抗CD3可溶性抗体50μl（终浓度为1μg/ml）。

4）加入终浓度为5ng/ml rhTGF-β1、20ng/ml rmIL-6、10μg/ml抗IFN-γ与10μg/ml抗IL-4。

5）采用含10% FBS的RPMI-1640将各孔总体积均补至200μl，混匀后将96孔板置于37℃，5% CO_2的细胞培养箱中培养4d。

6）培养 4d 后收集分化的 Th17 细胞，鉴定相应的细胞因子分泌情况。常用的方法与 Th1 和 Th2 细胞的诱导培养中的鉴定方法类似，也是两种：①将分化的细胞采用诱导时相同的活化条件（抗 CD3/抗原提呈细胞）活化 24h 后收集上清，ELISA 检测上清中的 IL-17 的水平；②采用细胞因子胞内染色法检测细胞内细胞因子的分泌情况，即将细胞采用 5ng/ml PMA 与 500ng/ml 的 ionomycin 并在 10μg/ml Brefeldin A 存在的条件下再刺激 4h，然后采用荧光标记的抗 IL-17 抗体进行胞内标记以及流式上样与分析。

注意事项

1）由于研究表明 IL-21 与 IL-23 在 Th17 的分化过程中的促进作用，可在诱导体系中加入 IL-21 或 IL-23 以更好地诱导 Th17 的产生。

2）目前国际上诱导 Th17 所采用的 TGF-β1 均为基因重组的人源性的 TGF-β1。

3）各种细胞因子与阻断性抗体也需保存于－20℃或－80℃，并应避免反复冻融。

二、$CD8^+$ T 细胞分离培养以及 CTL 的体外诱导

CTL 的诱导可以分为抗原特异性 CTL 和不考虑抗原特异性的总 CTL 两种方案，这里以抗原特异性 CTL 的诱导为例。其原理为：外周血淋巴细胞包含针对不同抗原的特异性 CTL 克隆，在体外经某一特定抗原刺激后，能识别该抗原的 T 细胞克隆被选择性激活、增殖，而其他 T 细胞克隆则逐渐死亡；经 3 或 4 次刺激后，存活的均为识别特异性 MHC/抗原肽复合物的细胞，即抗原特异性 CTL。不考虑抗原特异性的总 CTL 的诱导时采用丝裂原或者抗 CD3 单克隆抗体，将反应细胞中所有的 CTL 前体都激活。

此处以 EB 病毒转化的 B 淋巴母细胞细胞株为刺激细胞，丝裂霉素灭活后用以激活 PBMC 中相应的 $CD8^+$ T 细胞，经过一段时间的培养，没有被激活的细胞相继死亡，而活化的细胞能够存活下来并在刺激下不断增殖，形成 CTL 细胞。

材料与试剂

丝裂霉素 C（Sigma）：用培养液或 PBS 配制 0.5mg/ml

RPMI-1640 完全培养基

刺激细胞：EB 病毒转化的 B 淋巴母细胞株

反应细胞：外周血单个核细胞（PBMC）

步骤

1）外周血分离 PBMC，无血清 1640 洗 2 遍，调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml，待用。

2）取 EB 病毒转化的 B 淋巴母细胞（2×10^6 个/ml），加入丝裂霉素 C，最终浓度为 25μg/ml，于 37℃水浴中作用 30min，1000r/min 离心 5min，弃上清，沉淀细胞用 1640 液洗涤 3 次并计数。

3）取 2×10^6 个 PBMC 于 24 孔板中，加入经丝裂霉素 C 处理的刺激细胞 2×10^6 个，混匀，用完全培养基（RPMI-1640）补总体积至 2ml。

4）静置于培养箱中，37℃，5%CO_2；4d 后半量换液，继续培养 3d。

5）必要时每周按相同程序刺激效应细胞一次，3 或 4 次后，收集不贴壁细胞即为 CTL。

注意事项

1）如为小鼠 CTL，反应细胞可以为体内致敏的小鼠脾脏细胞。
2）丝裂霉素处理后的刺激细胞要求多次清洗，彻底去除残留的丝裂霉素，以免在诱导 CTL 时抑制增殖。
3）也可用 γ 射线照射处理刺激细胞。
4）培养过程中加入适量的 IL-2 可以提高 CTL 活性。
5）初次实验时应当把反应细胞∶刺激细胞设置为 3 种比例（一般取 2∶1、1∶1、1∶2），选择最好的组进行实验。

第四节　T 细胞克隆及 T 细胞杂交瘤的建立

T 细胞在机体获得性免疫应答中发挥举足轻重的作用，其特异性识别的靶分子与 B 细胞（或抗体）明显不同，不是抗原分子上的天然表位，而是由 MHC 分子提呈的抗原肽（T 细胞表位）。由于 T 细胞识别的这种特点，决定了对其特异性的研究必须考虑抗原肽的性质和提呈抗原肽的 MHC 分子型别。而表达相同的 TCR，结合相同的 MHC 分子抗原肽复合体的均一 T 细胞群体称为 T 细胞克隆。T 细胞克隆的建立对于 T 细胞在免疫应答中的功能研究具有重要的意义。

T 细胞杂交瘤的建立是近年来发展起来的一项免疫学新技术，它是继 B 细胞杂交瘤后细胞融合技术在免疫学研究中的又一成功应用。T 细胞杂交瘤既具有亲代正常 T 细胞执行免疫功能的能力，又具有亲代瘤细胞在体外培养中增殖的特点，它的建立对于研究 TCR 特异性识别抗原以及 CD3-TCR 复合物的生物化学和分子生物学都具有重要的意义。

一、人 T 细胞克隆的建立

T 细胞克隆是将机体内极少数量的抗原特异性 T 细胞在体外活化扩增，然后采用单细胞克隆的技术获得抗原特异性的均一的 T 细胞。通过 T 细胞克隆获得的均一的 T 细胞群体，能够排除其他细胞群体的干扰，有利于对其进行特性及信号转导等方面的研究。另外，体外大量获得的抗原特异性 T 细胞克隆也可能应用于过继治疗，如针对肿瘤抗原的特异性的 T 细胞克隆可用于肿瘤的治疗。

T 细胞克隆可分为抗原特异性 T 细胞克隆与抗原非特异性 T 细胞克隆。抗原特异性 T 细胞克隆主要有两种：一种是针对同种异型的抗原具有特异性，另一种是针对某种特定的抗原具有特异性；抗原非特异性 T 细胞克隆即 T 细胞在活化的过程中用一些非特异性活化的丝裂原或活化抗体诱导得到的 T 细胞，一般采用植物凝集素（PHA）和 IL-2 或者抗 CD3、抗 CD28 和 IL-2。

T 细胞克隆的传统方法是有限稀释法，这种方法分为两步。因为各种来源的淋巴细

胞群体（如外周血和脾脏）中对某一抗原特异性 T 细胞的数量与比例极低，不易直接分离，所以，第一步首先在体外用特定抗原反复刺激这种细胞群体，从而在体外获得数量较多且比例很高的抗原特异性 T 细胞，第二步采用有限稀释培养的方法获得均一的 T 细胞单克隆。另外如果需要 T 细胞有特定的 Th1 或 Th2 倾向，也可以在活化扩增的过程中加入 Th1 或 Th2 培养条件（见第三节）。在获得单克隆之后对所建立的 T 细胞克隆的抗原特异性与增殖能力等性质进行鉴定。

随着免疫学技术的发展，人们也开发出 T 细胞克隆建立的一些新方法，包括 CFSE 标记的流式细胞术分离法和基于 Tetramer-MHC 分子标记的方法。

CFSE 标记的流式细胞术分离法以实例简介如下。根据 Turcanu 等（2003）的报道，考虑到在人外周血中，抗原特异性 T 细胞的比例是很低的，为了研究不同人群中抗原特异性 T 细胞在被抗原活化后细胞因子表达谱的特点，并阐明其与疾病的相关性，作者在体外用 CFSE 标记了 PBMC，随后采用抗原进行刺激，发生增殖的细胞 CFSE 低表达，因此可用流式细胞仪分选出 $CFSE^{low}$ 的细胞，即为抗原刺激后发生分裂的抗原特异性 T 细胞。然后通过有限稀释法获得 T 细胞的克隆。这种方法能直接筛选出目的细胞的群体，避免了第一步扩增时期反复的刺激，减少了工作量，但需要采用流式细胞仪分选的技术，成本和设备要求较高，可供有条件的实验室选择使用。

随着 Tetramer 技术的发展，抗原特异性 T 细胞有的可以直接采用抗原特异性的 Tetramer 进行标记，然后对目的 T 细胞进行分离。其基本流程为：首先通过流式细胞仪分选出 Tetramer 阳性 T 细胞，随后这种阳性的细胞通过稀释的方法以单细胞分开，并在 PHA 和 IL-2 存在的情况下发生增殖，增殖获得的细胞的鉴定可以通过抗原特异性增殖进行检测或者再次使用 Tetramer 标记的方法进行检测（Reijonen and Kwok，2003）。这种方法虽然方便，但成本和试剂要求也比较高，需要有特定的某种抗原肽的 Tetramer 才能应用。

根据实验的不同需求和实验室的不同条件，可以灵活运用上述这些方法。对于人来说，淋巴细胞的来源主要是外周血，而对于小鼠来说，其来源可以为各种免疫器官，如脾脏与淋巴结。但其建立 T 细胞克隆的基本原理是一样的，这里主要介绍采用有限稀释法制备人同种异体抗原特异性 T 细胞克隆的经典流程与具体方法。

材料与试剂

外周血单个核细胞（PBMC），来自健康志愿者，作为反应细胞

照射灭活的同种异体 PBMC 或同种异体 EBV-B 细胞（EB 病毒转化的自体 B 细胞）作为刺激细胞

含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基

植物凝集素（PHA）

抗 CD3 单抗

15ml 和 50ml 聚丙烯离心管

96 孔圆底培养板

24 孔培养板

步骤

1. 同种异体抗原特异性T细胞的诱导产生

1）采用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法分离人PBMC，用含10%FBS的RPMI-1640培养基将其浓度调成2×10^6个/ml，作为反应细胞。

2）制备照射灭活（40Gy）的同种异体PBMC，用含10%FBS的RPMI-1640培养基将其浓度调成2×10^6个/ml，作为刺激细胞。

3）分别将0.5ml的反应细胞（1×10^6个）与0.5ml的刺激细胞（1×10^6个）加入到24孔培养板中，培养总体积为1ml。

4）细胞置37℃，5%CO_2细胞培养箱中培养10d，其间不需补充培养基和生长因子。

5）培养第10天，收集细胞，用培养基洗涤1次后计数。

6）进行二次刺激：用1×10^6个照射灭活（40Gy）的同种异体PBMC与1×10^6个上述激活的T细胞共培养，细胞培养条件同初次刺激。

7）二次刺激后5～7d收集细胞，用培养基洗涤1次后计数，然后同上一步骤进行下一轮刺激，或者直接进行T细胞克隆。

2. T细胞的克隆（有限稀释法）

1）如下所示准备2×饲养细胞混合物：5×10^5个/ml照射灭活的同种异体PBMC、5×10^4个/ml照射灭活的EBV-B细胞、0.2μg/ml PHA或1μg/ml抗CD3单抗，冰浴备用。

2）收集待克隆的T细胞，洗涤1次后，加入含10%FBS的RPMI-1640培养基调整浓度为1×10^5个/ml。

3）将上述饲养细胞悬液预热至37℃后，在15ml试管中，用饲养细胞悬液作为稀释液，将T细胞分别稀释至10^4个/ml、10^3个/ml和10^2个/ml。

4）将上述不同浓度的细胞悬液各100μl，加入96孔圆底培养板中（各浓度5～10个复孔）（如果培养5～7d后，孔中仍无细胞生长，应重新开始实验）。

5）在50ml离心管中，将细胞从100个/ml开始进行系列稀释（10个/ml、3个/ml和1个/ml），然后各取100μl加入96孔圆底培养板中（各浓度5～10个复孔）。将培养板置培养箱中培养。

6）5d后，每孔加入100μl含4ng/ml rIL-2的培养基。当个别孔培养基变为黄色时，更换新鲜的含4ng/ml rIL-2的培养基100μl。

7）10～14d后，各取100μl细胞培养上清加入96孔板中，检测不同T细胞克隆培养上清中细胞因子的水平。

8）挑选合适的阳性T细胞克隆转入24孔细胞培养板中，培养基总体积0.5ml，再加入0.5ml 2×饲养细胞混合物悬液进行细胞扩增。

3. 克隆后T细胞的扩增与维持

1）如下所示准备2×饲养细胞混合物：2×10^6个/ml照射灭活（40Gy）的PBMC、

2×10^5 个/ml 照射灭活（50Gy）的 EBV-B 细胞（应表达制备该 T 细胞克隆时的同种异体抗原）、100ng/ml PHA，4℃保存备用。

2）收集 T 细胞，洗涤后，用培养基调整浓度为 4×10^5 个/ml。如果死细胞较多，用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法重新分离后进行实验。

3）取 0.5ml T 细胞悬液加入 24 孔培养板中，再加入 0.5ml 2×饲养细胞混悬液，然后置细胞培养箱培养。

4）3～4d 后，用含 10ng/ml rIL-2 的培养基将细胞传代扩增。必要时，第 7～10 天再用含 2ng/ml rIL-2 的培养基继续扩增。根据情况，此时可将细胞冻存。整个培养期间，T 细胞密度应维持在 5×10^5～1×10^6 个/ml。

5）当 T 细胞体积变小进入静息期时（通常在 10～14d），从步骤 1）开始重新扩增细胞。

4. T 细胞的冻存

同常规的细胞冻存方法。

注意事项

1）因为 T 细胞克隆的制备是一个长期的过程，存在污染的可能，加入抗生素能够防止细菌的污染，但不能防止支原体的污染。支原体污染会改变 T 细胞的功能特点，所以推荐定期进行支原体筛查。

2）刺激细胞与反应细胞的 HLA Ⅰ类或Ⅱ类抗原（分别用于 $CD8^+$ 或 $CD4^+$ T 细胞克隆）必须来源于两个不同的个体，而且应不相容。

3）建议尽早进行和经常冻存 T 细胞克隆，因为 T 细胞克隆的寿命是有限的，另外随着扩增次数的增加，增殖的能力逐渐减弱。

二、T 细胞杂交瘤技术

T 细胞杂交是继 B 细胞杂交后细胞融合技术在免疫学研究中的又一成功应用。众所周知，正常的 T 细胞难于在体外长期生长；而 T 淋巴瘤细胞则可在体外条件下无限增殖。将激活的 T 细胞与酶缺陷型淋巴瘤细胞融合，通过有限稀释克隆，可获得特异性表达 T 细胞受体 TCR 或其他功能的杂交瘤 T 细胞。分别来自于两个亲代细胞的性状均可由 T 杂交瘤子代细胞所表现出来，T 杂交瘤既具有亲代正常 T 细胞执行免疫功能的能力，又具有亲代瘤细胞在体外培养中或作为移植瘤在动物体内增殖繁衍的特性。T 细胞杂交瘤的建立对于研究 TCR 特异性识别抗原以及 CD3-TCR 复合物的生物化学和分子生物学都具有重要的意义。

细胞合成 DNA 有两条途径：一条是主要途径，利用糖和氨基酸合成核苷酸，进而合成 DNA，叶酸拮抗剂氨基蝶呤可阻断该途径；另一条为补救合成途径，当叶酸缺乏时，细胞通过 HGPRT（次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶）和 TK（胸腺嘧啶核苷激酶），利用核苷酸的前体合成核苷酸，继而合成 DNA。HAT 培养基中的 A 可以阻断叶酸代谢，迫使细胞通过补救合成途径，依靠 HGPRT 利用培养基中的 H 和 T 合成 DNA，由于骨髓瘤细胞缺乏 HGPRT 和 TK，不能通过补救途径合成 DNA 而死亡；而

T细胞本身不能长期培养，一段时间内会自然死亡；只有异核杂交瘤细胞，从T细胞获得了HGPRT，从骨髓瘤获得了不断增殖能力，能够在HAT培养基中生长增殖。

T细胞杂交瘤的建立过程基本上与B细胞杂交瘤技术相同（图4-1），但是细胞的激活过程和阳性克隆的选择较为复杂，其主要步骤可分为：①特异性T细胞的活化；②细胞融合；③杂交瘤的筛选。大体来说：首先以PEG处理骨髓瘤和T细胞，诱导其融合，形成多种细胞成分的混合体，包括未融合的游离亲本细胞、骨髓瘤细胞之间的融合、T细胞之间的融合，以及骨髓瘤同T细胞之间的融合，仅仅后者才能形成杂交瘤；然后采用HAT培养基，对以上细胞混合体进行选择，只有骨髓瘤同T细胞间融合的异核细胞才能够存活下来，而其他细胞群体因不能由补救途径有效合成DNA而不断减少，直至消失；得到的杂交瘤在HT培养基中扩增，最后采用有限稀释法进行筛选，得到可供实际应用的细胞克隆。此处以筛选$OVA_{323\text{-}339}$特异性$CD4^+$ T细胞克隆为例。

步骤



图4-1 T细胞杂交瘤筛选流程图

材料与试剂

相应淋巴瘤细胞系，如BW5147

DMEM完全培养基

2×HAT选择培养基［HAT系次黄嘌呤（hypoxantin）、氨基蝶呤（aminopterin）和胸腺嘧啶脱氧核苷（thymidin）3种物质的英文单词首字母缩写］

洗涤培养基：不含FBS的DMEM

50%（质量体积比）PEG（聚乙二醇）溶液

1×HT培养基［含次黄嘌呤（hypoxanthine）和胸腺嘧啶核苷（thymidine）］

96孔、24孔平底细胞培养板

1. T细胞的激活

主要分为可溶性抗原诱导的T细胞和同种异型抗原诱导的T细胞（以可溶性抗原诱导的T细胞为例）。

1）在融合实验进行前，用完全弗氏佐剂乳化 OVA 后免疫小鼠，并加强免疫 3 或 4 次。

2）最后一次免疫 7d 后，取腋下、腹股沟和肠系膜的引流淋巴结，分离纯化 T 细胞，用相应的抗原和抗原提呈细胞（照射灭活的同基因型的脾脏细胞）在体外培养 3d。

2. 细胞融合、扩增

1）饲养细胞的制备：小鼠 T 细胞融合以同系小鼠胸腺细胞作为饲养细胞，在融合当天制备胸腺细胞悬液，以完全培养基调整细胞浓度为 $0.5\times10^7\sim1\times10^7$ 个/ml。

2）取对数生长期的淋巴瘤细胞 BW5147，与 T 细胞以 1∶1 的比例混合，加 20ml 37℃预热的 DMEM 洗涤培养基，1000*g* 离心 5min，弃上清。

3）将离心管置于 37℃水浴中，吸取 1ml 预热的 50%PEG 缓慢滴入离心管内，1min 内加完，其间不断轻柔地混匀细胞。

4）静置 1min 后，加入 9ml 预热的洗涤培养基以终止 PEG 的融合作用。

5）离心，弃上清。以 10ml 胸腺细胞悬液重悬，铺板。采用 96 孔平底板，每孔滴入 2 滴约 0.1ml 细胞悬液。

6）培养 1d 后，每孔加入 2 滴约 0.1ml 的 2×HAT 培养基进行选择性培养。

7）6～7d，当杂交瘤细胞可见时，以 2×HAT 半量换液。当孔底细胞覆盖 50% 时，转移细胞到 24 孔板中，每孔加入 1ml 1×HT 培养基进行扩增。

8）当 24 孔板中细胞生长良好，铺满 50%时，取一半细胞到另一个孔，复制两孔相同的细胞。再次生长满时，取其中一孔进行筛选。

3. 克隆的筛选

1）CD3-TCR 阳性杂交瘤的初筛：取少量细胞，以 CD3 抗体标记，流式细胞仪检测，阳性细胞进一步培养选择。

2）对于每一种待检测的杂交瘤，以 96 孔平底板，取 6 孔，分 3 组，每组 2 孔。第一组为杂交瘤本身，第二组为杂交瘤和正常脾脏细胞，第三组为杂交瘤、脾脏细胞加上 $OVA_{323\text{-}339}$。

3）培养 24h 之后取上清，检测 IL-2 含量，对比各孔差异。含有目的杂交瘤细胞的孔，其第 3 组细胞因子的分泌要远远高于前两组。

4）将所需的杂交瘤细胞通过有限稀释法克隆并冷冻保存。

注意事项

1）单次免疫小鼠产生的 T 细胞用于融合可能效果不够理想，最好能够采用多次加强免疫后的淋巴细胞。

2）在融合后第 3 天应当将细胞置于倒置显微镜下观察，此时应当是非融合细胞死亡，而融合细胞尚未生长起来，如果没有观察到大量的细胞死亡，说明 HAT 选择培养基的有效性存在问题。

3）实验采用 96 孔平底板，圆底板也可，但是不太便于观察。

4）融合过程中所有液体培养基都需要预热。

第五节　T细胞增殖实验

T细胞在受到非特异性刺激因素或特异性抗原的刺激后，导致细胞活化，随后活化的T细胞发生增殖。细胞增殖作为T细胞的重要功能之一，其检测已被广泛应用。本节主要介绍$CD4^+$ T细胞与$CD8^+$ T细胞的体外增殖反应与体内增殖反应的检测方法。

一、体外增殖检测

（一）[^{3}H] 胸腺嘧啶掺入法

T细胞的增殖可伴随细胞内DNA的合成，在细胞增殖的高峰期时可通过加入[^{3}H] 胸腺嘧啶到培养体系中，处于增殖的T细胞可摄取[^{3}H] 胸腺嘧啶用于合成DNA，因此可以通过检测掺入到细胞内DNA的[^{3}H] 胸腺嘧啶的放射性强度，从而反映T细胞的增殖情况。

本方法的优点是简单方便，灵敏度高；缺点是由于高灵敏度而引起的高变异性，另外放射性污染也是该法的缺点之一，应在使用该法时严格防护以避免放射性污染对人体的伤害。本方法以混合淋巴细胞反应的活化体系为例进行介绍。

材料与试剂

BALB/c小鼠（雌性，6～8周龄，SPF级别）
C57BL/6J小鼠（雌性，6～8周龄，SPF级别）
50μCi/ml [^{3}H] 甲基胸腺嘧啶
100%（体积比）甲醇
闪烁液
多孔细胞收集器
细胞收集器配套用滤纸
闪烁管
β液闪仪

步骤

1）反应细胞的制备：取BALB/c小鼠脾脏并制备成单细胞悬液，采用磁珠分选或其他方法纯化获得T淋巴细胞（详见第二节），获得细胞后采用含10% FBS的RPMI-1640调整细胞浓度为2×10^6个/ml，在96孔圆底板每孔中加入50μl的细胞（1×10^5个/孔），每组设3个复孔。

2）刺激细胞的制备：采用经射线照射或采用丝裂霉素C处理过的且剔除T细胞的C57BL/6J小鼠脾脏细胞悬液作为刺激细胞，将刺激细胞的浓度调为2×10^6个/ml，在上述96孔板的每孔细胞中加入50μl的刺激细胞（刺激细胞：反应细胞的比例为1：1）。同时设置反应细胞与刺激细胞单独培养的对照组各3孔。

3）采用含10% FBS的RPMI-1640将各孔总体积均补至200μl，混匀后将96孔板

置于 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养 3～5d。

4）在终止培养前 6～8h，在每孔中加入 20μl 浓度为 50μCi/ml 的［^{3}H］胸腺嘧啶（每孔 1.0μCi）。

5）使用全自动多孔细胞收集器，洗涤、裂解细胞至少 10 次以将细胞 DNA 充分转移至滤纸上。采用 100%甲醇洗涤滤纸条，使滤纸条易于干燥。然后在闪烁管中加入闪烁液。

6）用 β 液闪仪检测样品的 cpm 值，要求标准差小于 2%。计算本底和样品的平均 cpm 值。计算本底和样品的平均 cpm 值。复孔的变异度应小于 20%。

7）Δcmp 值的计算：用实验组（加刺激细胞组）3 个复孔的 cmp 平均值减去对照组（未加刺激细胞组）3 个复孔的平均值，即可得出实验组的 Δcmp 值。

注意事项

1）延长［^{3}H］胸腺嘧啶掺入时间，常可改善实验的重复性。

2）使用半自动细胞收集器时，需将滤纸片放入对应的闪烁管中；人工收集时，将滤纸片置灯下烘干，然后用镊子将滤纸加入对应的闪烁管中。

3）本底的微小变化将引起结果的极大变化，在分析结果时应特别注意。

4）在检测完毕后应根据仪器使用说明书彻底清洗细胞收集器。

5）实验人员应注意放射性射线的防护并尽量减少放射性射线对周围环境的污染。

（二）流式细胞仪计数法

T 细胞在增殖时除了 DNA 合成增加外，最直接的结果就是细胞数量的明显增加，因此可以采用 T 细胞表面标志（如 CD4 或 CD8）的荧光抗体联合排除死细胞的试剂 PI 或 7-AAD 标记出存活的特定的 T 细胞群体，然后在进行流式细胞仪上样时控制相同的上样体积，并设置相同的收集细胞的时间，同时设置已知数量的内参照（荧光标记的微球），通过这些标准化方法可对标记出的 T 细胞群体进行准确的计数，从而对 T 细胞的增殖进行定量。

本方法的优点是可以准确计数培养体系中所有的存活的 T 细胞，通过细胞数量的增加判定细胞的增殖，可以准确反映相对于培养前的细胞增殖的倍数，并且可以避免采用［^{3}H］胸腺嘧啶掺入法所带来的放射性污染；缺点是不能明确细胞数量的增加在存在细胞增殖的同时是否存在细胞存活能力的提高。

本方法以可溶性抗 CD3 单抗联合抗原提呈细胞诱导非特异性 $CD4^+$ T 淋巴细胞的增殖反应为例进行介绍。该法同样适用于检测抗原特异性 T 淋巴细胞的增殖反应与混合淋巴细胞的增殖反应。

材料与试剂

C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）

抗 CD3

CD4-FITC

7-AAD（Sigma）

直径 3μm PE 标记的珠子
抗 CD16/32 抗体
96 孔圆底培养板
流式细胞仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤

1）反应细胞的制备：取 C57BL/6J 小鼠脾脏并制备成单细胞悬液，采用磁珠分选获得 CD4 阳性细胞（详见第二节），然后采用含 10%FBS 的 RPMI-1640 调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml，在 96 孔圆底板每孔中加入 50μl 的细胞（1×10^5 个/孔），每组设 3 个复孔。

2）抗原提呈细胞的制备：采用经培养的 C57BL/6J 小鼠骨髓来源成熟树突状细胞作为抗原提呈细胞，将其浓度调为 2×10^5 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入 50μl 的抗原提呈细胞（抗原提呈细胞：反应细胞的比例为 1∶10）。同时设置反应细胞与抗原提呈细胞单独培养的对照组各 3 孔。

3）加入浓度为 4μg/ml 的抗 CD3 可溶性抗体 50μl（终浓度为 1μg/ml）。

4）采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 将各孔总体积均补至 200μl，混匀后将 96 孔板置于 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养 4d。

5）在培养终止时，小心收集上清备用（可用于检测上清中的细胞因子），加入抗 CD16/32 抗体在 4℃封闭 15min 后，再加入抗 CD4-FITC，4℃标记 15min，最后 5min 加入 7-AAD。

6）PBS 洗涤细胞一次，去上清加入 PBS 200μl，并加入 1×10^5 个直径为 3μm PE 标记的微珠作为内参照，用流式细胞仪进行分析，并在高速下收取样品 52s。

7）分析时，以 7-AAD 阴性、CD4 阳性的细胞作为活细胞，计算活细胞数，活细胞绝对数＝(活细胞相对数/珠子相对数)$\times10^5$。

注意事项

1）在样品准备过程中应保证各组细胞标记的一致性以及上样前体积的准确性，在上样时保证收取样品时间的均一性，这样可以减少实验的标准差。

2）由于 7-AAD 对细胞有一定的毒性作用，在标记后应尽量在半小时内进行流式上样。

3）在收取样品的设置时，应选用时间/计数模式，且所有样品的设置时间应相同（范围为 30～90s，时间太短或太长均可增加实验误差），相应的计数量可设置尽可能大，远超过预期的细胞数量，以避免在未达到设置时间时所收取的细胞数就超过设置的计数量，从而中断收取样品。

（三）CFSE 分裂法

羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯（CFSE）可通透细胞膜进入细胞，原先为无色且不发生荧光，在进入细胞后可被细胞内酯酶催化分解成高荧光强度的物质并与细胞内胺稳定结合，从而使细胞标记上高荧光强度的 CFSE。被 CFSE 标记的非分裂细胞的荧光

非常稳定，细胞分裂时荧光可被平均分配，因此每分裂一次子代细胞的荧光会减弱一半，甚至可达 8 次分裂仍可被流式检测到，直到荧光减弱至未标记细胞的本底荧光。可以通过计算不同分裂代数的细胞群的细胞比例来反映细胞的增殖情况。CFSE 已被广泛应用于 T 淋巴细胞的增殖的体内或体外检测，并可用于追踪 T 淋巴细胞的体内迁移与组织定位。图 4-2 所示为 CFSE 标记的 $OVA_{323-339}$ 特异性 OT-2 $CD4^+$ T 细胞在 $OVA_{323-339}$ 与成熟树突状细胞存在的刺激条件下培养 1d 与 3d 的 $CD4^+$ T 细胞的 CFSE 分裂情况。

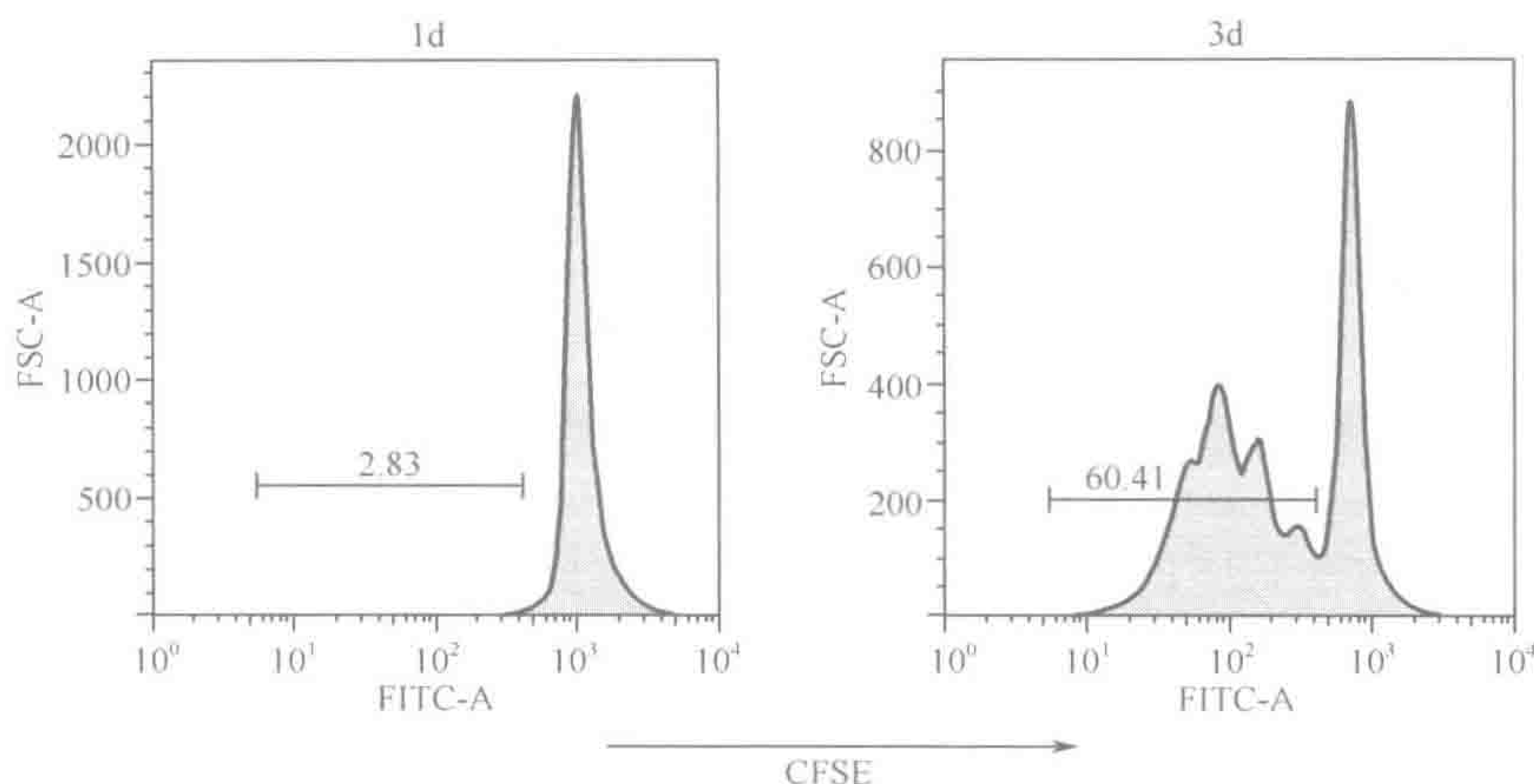


图 4-2　CFSE 法检测 T 细胞增殖

该方法的优点是可以观察 T 淋巴细胞的细胞分裂情况，同时在分析时标记上其他功能相关的标志可研究细胞分裂与细胞功能间的关系。缺点是 CFSE 对细胞存在一定的毒性作用，部分影响了细胞的增殖，因此不同的细胞与不同的实验目的应选择适当的标记浓度与标记条件。

本方法以混合淋巴细胞反应的活化体系为例进行介绍。

材料与试剂

BALB/c 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）

C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）

PBS，pH7.4

含 0.1% BSA 的 PBS

5mmol/L CFSE 贮存液（Molecular Probe 公司）

0.5mmol/L EDTA 的 PBS 溶液

能检测 3 色荧光的流式细胞分析仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤

1）反应细胞的制备：取 BALB/c 小鼠脾脏并制备成单细胞悬液，采用磁珠分选或其他方法纯化获得的 T 淋巴细胞（详见第二节），获得细胞后采用含 0.1% BSA 的 PBS 调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml。

2）加入等体积的 10μmol/L CFSE 工作液（根据需要的量现配），使标记浓度为 5μmol/L，37℃水浴孵育 10min。

3）加入 5 倍体积的含 10%FBS 的 RPMI-1640 完全培养基，冰上孵育 5min 后室温下 300*g* 离心 5min，共洗涤 3 次。

4）将标记好的反应细胞采用含 10%FBS 的 RPMI-1640 调成浓度为 2×10^6 个/ml，在 96 孔圆底板每孔中加入 50μl 的细胞（1×10^5 个/孔），每组设 3 个复孔。

5）刺激细胞的制备：采用经射线照射或采用丝裂霉素 C 处理过的且剔除 T 细胞的 C57BL/6J 小鼠脾脏细胞悬液作为刺激细胞，将刺激细胞的浓度调为 2×10^6 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入 50μl 的刺激细胞（刺激细胞：反应细胞的比例为 1：1）。同时设置反应细胞与刺激细胞单独培养的对照组各 3 孔。

6）采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 将各孔总体积均补至 200μl，混匀后将 96 孔板置于 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养 3～5d。

7）收集培养的细胞采用 0.5mmol/L EDTA-PBS 在 37℃孵育 5min，以使增殖的细胞集落散开。

8）采用荧光抗体标记目的 T 细胞的表面标志（如 CD3），然后进行流式细胞仪上样与分析。

9）获取的数据采用软件进行分析，计算 CFSE 各分裂代数的细胞百分比。

注意事项

1）细胞标记 CFSE 后不能马上检测，因为这时的荧光强度极高，细胞摄入的大部分 CFSE 尚不稳定。

2）漂洗时加入含血清的完全培养基可减少 CFSE 对细胞的毒性作用。

3）如果计划在 24h 以内检测 CFSE 标记的细胞，应采用常用 CFSE 浓度的 1/4 或 1/8 进行标记。

4）应设置未标记的反应细胞与标记的未刺激的反应细胞作为对照，以利于结果的分析。

二、体内增殖检测

（一）CFSE 分裂法

CFSE 除了可以用于检测 T 淋巴细胞的体外增殖外，也被广泛应用于检测 T 淋巴细胞的体内增殖情况。可以将要研究的 T 淋巴细胞采用 CFSE 进行标记后过继给受体小鼠，在受体小鼠体内经历活化与增殖，适当的时间取出小鼠的淋巴器官采用荧光抗体标记感兴趣的 T 细胞亚群，然后流式检测其 CFSE 分裂情况。

本方法以 $OVA_{323\text{-}339}$ 抗原特异性的 OT-2 $CD4^+$ T 细胞在受体小鼠内采用弗氏完全佐剂抗原乳液进行活化后的体内增殖的检测为例进行介绍。首先获得 OT-2 $CD4^+$ T 细胞并采用 CFSE 标记后经尾静脉注射过继给受体小鼠，1d 后制备 OVA 与弗氏完全佐剂的乳剂，并对受体小鼠进行皮下免疫，在免疫后一定时间内可取出局部引流淋巴结细胞检测过继的 OT-2 $CD4^+$ T 细胞的 CFSE 分裂情况。

材料与试剂

C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）

OT-2 小鼠（C57BL/6J 背景，Jax 公司，雌性，6～8 周龄，SPF 级别）

OVA（Sigma）

弗氏完全佐剂（Sigma）

PBS，pH7.4

含 0.1% BSA 的 PBS

5mmol/L CFSE 贮存液（Molecular Probe 公司）

含 0.5mmol/L EDTA 的 PBS 溶液

能检测 3 色荧光的流式细胞分析仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤

1）取 OT-2 小鼠的脾脏与淋巴结并制备成单细胞悬液，采用磁珠分选获得 CD4 阳性细胞，并用含 0.1% BSA 的 PBS 混悬，细胞浓度调为 2×10^6 个/ml。

2）加入等体积的 10μmol/L CFSE 工作液（根据需要的量现配），使标记浓度为 5μmol/L，37℃水浴孵育 10min。

3）加入 5 倍体积的含 10%FBS 的 RPMI-1640 完全培养基，冰上孵育 5min 后室温 300*g* 离心 5min，共洗涤 3 次。

4）将标记好的 OT-2 $CD4^+$ T 细胞采用 PBS 混悬，并将细胞浓度调成 1×10^7 个/ml，每只小鼠经尾静脉注射 200μl，共 2×10^6 个/只。

5）24h 后采用弗氏完全佐剂 OVA 乳剂对受体小鼠进行免疫，根据待检测的淋巴器官选择免疫部位，可以为足垫、背部皮下或腹腔，抗原的剂量为 100μg～1mg。

6）在一定时间后取出受体小鼠的淋巴器官，获取淋巴细胞的单细胞悬液。

7）荧光抗体标记目的 T 细胞的表面标志（如 CD4-PE），然后进行流式分析。

8）获取的数据采用软件进行分析，计算 CFSE 各分裂代数的细胞百分比。

注意事项

1）如果计划在 24h 以内检测 CFSE 标记的细胞，应采用常用 CFSE 浓度的 1/4 或 1/8 进行标记。

2）注射超过 5×10^7 个细胞会使小鼠淋巴器官达到饱和，在此饱和点之前注射细胞数与进入淋巴器官的细胞数呈线性关系。

3）OVA 与弗氏完全佐剂的乳液应新鲜制备，并在注射免疫前检验乳液是否稳定（将混合物挤出一小滴使其落到 50ml 的冷水表面上，若液滴不散开则表明乳液已制备成功）。

（二）BrdU 掺入法

5-溴-2′-脱氧尿苷（BrdU）是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物，可在细胞周期的 S 期掺入到细胞的 DNA 中，因此可采用特异性的针对 BrdU 的单克隆抗体对其进行检测，从而反映细胞的增殖情况。根据实验目的给予动物不同剂量与时程的 BrdU，然后获取

动物淋巴器官，体外采用荧光抗体标记特定的 T 细胞群体，并采用固定、打孔及 DNA 酶处理后胞内标记荧光标记的抗 BrdU 抗体，然后检测 BrdU 阳性细胞的比例，从而反映该群细胞的增殖情况，而且还可以比较不同细胞亚群的体内增殖情况。

该方法的优点是可以简便地对体内特定的细胞亚群进行增殖情况的检测，尽管其掺入原理与 [^{3}H] 相同，但是 [^{3}H] 只能检测整个群体细胞或纯化的细胞亚群的增殖，因此该方法无需对细胞进行纯化即可通过体外标记的方法检测细胞亚群的体内增殖情况。

材料与试剂

C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）

0.8mg/ml BrdU（Sigma）水溶液（口服用）

4mg/ml BrdU PBS 溶液（注射用）

冰冷的 95%乙醇

多聚甲醛固定及打孔液 [含有溶于 PBS 的 1%（质量体积比）多聚甲醛与 0.01%（体积比）Tween 20]

DNase Ⅰ溶液(50Kunitz U/ml,溶于4.2mmol/L $MgCl_2$/0.15mol/L NaCl,pH 5)

PBS，pH 7.4

0.15mol/L 冰冷的 NaCl

抗 BrdU-FITC（BD Pharmingen）

能进行三色或四色分析的流式细胞仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤

1）通过饮水给予 BrdU（含 0.8mg/ml BrdU 的无菌饮用水），或采用静脉或腹腔注射给予 BrdU（浓度为 4mg/ml 的 BrdU PBS 溶液，每只小鼠注射 0.2ml，即 0.8mg），给药时间及次数因实验目的各异。

2）取淋巴器官制备单细胞悬液，以备对细胞进行免疫荧光检测。

3）采用荧光抗体标记目的 T 细胞的表面标志。

4）加入 1ml PBS，4℃下 300*g* 离心 5min；去上清后用 0.5ml 冰冷的 0.15mol/L NaCl 混悬细胞。

5）轻轻振荡细胞，同时逐滴加入 1.2ml 冰冷的 95%乙醇以避免细胞聚团，冰浴 30min 后加入 2ml PBS，4℃下 450*g* 离心 5min。

6）彻底弃上清，加入 1ml 多聚甲醛固定及打孔液混悬细胞，室温放置 30min，4℃下 450*g* 离心 5min。

7）弃上清，加入 1ml DNase Ⅰ溶液混悬细胞，室温放置 10min，加入 2ml PBS，4℃下 450*g* 离心 5min。

8）弃上清，加入 50μl PBS 混悬细胞后再加入 10μl 抗 BrdU-FITC 抗体，室温孵育 30min，加入 2ml PBS，4℃下 450*g* 离心 5min。

9）用 300μl PBS 混悬细胞后即刻进行流式细胞分析或者 4℃避光保存不超过一周。

注意事项

1）BrdU 是一种可通过皮肤或呼吸道被吸收的潜在诱变剂。因此在操作时应穿戴

包括手套、保护眼睛和面部的防护镜在内的合适的防护设备。

2）因为 BrdU 对光敏感，需要每天更换新配的 BrdU 水溶液，并采用锡箔纸进行避光处理。

3）如果需要准确计算初始给药时间，可同时通过注射和饮水给予 BrdU。

4）由于胸腺细胞增殖活跃，一般可采用胸腺细胞作为 BrdU 标记的阳性对照。

5）如果采用碘化丙锭（PI）或 7-AAD 区分活细胞和死细胞，那么在固定和打孔之前再漂洗 4 或 5 次以去除所有细胞外的 PI 或 7-AAD。

第六节　抗原特异性 T 淋巴细胞反应

抗原特异性 T 淋巴细胞反应是指 T 淋巴细胞针对特定的抗原所产生的特异性的免疫反应，一般由抗原提呈细胞通过 MHC-Ⅰ类或Ⅱ类分子将抗原提呈给 T 淋巴细胞，促进其活化及增殖。在未接受免疫的小鼠或人体内，针对抗原的特异性 T 淋巴细胞的量是极少的，只有在采用特异性抗原连同佐剂进行免疫后其特异性 T 淋巴细胞的数量才会在经历初次免疫应答后出现明显增加。考虑到机体中内源性 T 细胞的数量太少而难以研究，近年来人们采用 TCR 转基因小鼠来源的 $CD4^+$ T 或 $CD8^+$ T 淋巴细胞来研究 $CD4^+$ T 或 $CD8^+$ T 淋巴细胞反应，而且除了采用过继回输给受体鼠后进行体内研究外（实例可参见第五节的 CFSE 分裂法检测 T 细胞体内增殖），在体外也可采用抗原与抗原提呈细胞诱导出相应的免疫反应。因此，本节主要介绍抗原特异性 TCR 转基因小鼠来源的 $CD4^+$ T 与 $CD8^+$ T 淋巴细胞的体外反应的诱导与检测方法。

一、$CD4^+$ T 淋巴细胞反应

常见的用于 $CD4^+$ T 细胞研究的 TCR 转基因小鼠有针对 $OVA_{323\text{-}339}$ 抗原肽的 DO11.10（BALB/c 背景）和 OT-2 小鼠（C57BL/6J 背景）以及针对 LCMV 病毒 $gp_{61\text{-}80}$ 表位的 SMARTA 小鼠（C57BL/6J 背景）等（小鼠具体情况详见本章第十节）。这些小鼠的应用大大地加快人们对于 $CD4^+$ T 淋巴细胞反应的理解与认识。本方法介绍 $OVA_{323\text{-}339}$ 抗原肽特异性 $CD4^+$ T 细胞的体外免疫反应的诱导与检测方法。

本方法的优点是可用于检测抗原提呈细胞的各种亚群促进 $CD4^+$ T 细胞活化与增殖的功能，而且可用于各种 Th 细胞亚群制备时 Th0 细胞的活化。缺点是体外的 $CD4^+$ T 淋巴细胞反应并不能完全模拟体内的情况，其增殖强度远远高于体内的实际情况。

材料与试剂

OT-2 小鼠（C57BL/6J 背景，Jax 公司，雌性，6～8 周龄，SPF 级别）
C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）
CD4-FITC
7-AAD
直径 3μm PE 标记的微珠
抗 CD16/32 抗体

400μmol/L 的 $OVA_{323-339}$ 抗原肽

检测细胞活化用的荧光标记抗体（CD25-PE、CD69-PE 与 CD44-PE）

96 孔圆底培养板

流式细胞仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤

1）OT-2 $CD4^+$ T 细胞的制备：取 OT-2 小鼠的脾脏制备成单细胞悬液，采用磁珠分选获得 CD4 阳性细胞（详见本章第二节），然后采用含 10%FBS 的 RPMI-1640 调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml，在 96 孔圆底板每孔中加入 50μl 的细胞（1×10^5 个/孔），每组设 3 个复孔。

2）抗原提呈细胞的制备：可选用的抗原提呈细胞主要有两种，即经射线照射或采用丝裂霉素 C 处理过的且剔除 T 细胞的 C57BL/6J 小鼠脾脏细胞悬液，或者经培养的 C57BL/6J 小鼠骨髓来源成熟树突状细胞。若为前者，则将抗原提呈细胞的浓度调为 2×10^6 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入 50μl 的抗原提呈细胞（抗原提呈细胞∶OT-2 $CD4^+$ T 细胞的比例为 1∶1）。若为后者，则将抗原提呈细胞的浓度调为 2×10^5 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入50μl 的抗原提呈细胞（抗原提呈细胞∶OT-2 $CD4^+$ T 细胞的比例为 1∶10）。同时设置抗原提呈细胞与 OT-2 $CD4^+$ T 细胞单独培养的对照组各 3 孔。

3）制备浓度为 800nmol/L 的 $OVA_{323-339}$ 液，往各孔里加入 50μl 使其终浓度为 200nmol/L。

4）采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 将各孔总体积均补至 200μl，混匀后将 96 孔板置于 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养 3～5d。

5）在培养终止时，采用［^{3}H］胸腺嘧啶掺入法或者流式细胞仪计数法检测 $CD4^+$ T 细胞的增殖情况（见本章第五节）；小心收集上清以备 ELISA 检测细胞因子分泌情况用；另外还可通过流式检测 CD25、CD44 与 CD69 来检测细胞活化情况，以及细胞因子胞内染色分析单个细胞水平的细胞因子分泌情况。通过这些方法可以评估免疫反应中 $CD4^+$ T 细胞的功能状态。

注意事项

为明确抗原特异性，最好设置相应的对照抗原（如 LCMV gp_{61-80}）的对照组别，即加入对照抗原后 $CD4^+$ T 细胞不会出现活化与增殖。

二、$CD8^+$ T 淋巴细胞反应

常见的用于研究 $CD8^+$ T 细胞反应的转基因小鼠有针对 LCMV 病毒 gp_{33-41} 表位的 P14 TCR 转基因小鼠以及针对 $OVA_{257-264}$ 抗原肽的 OT-1 小鼠等（小鼠具体情况详见本章第十节）。由于 $CD8^+$ T 细胞免疫反应相对于 $CD4^+$ T 细胞来说，其增殖强度更强，在初次免疫与免疫记忆期的细胞量均远多于 $CD4^+$ T 细胞，因此人们对它的研究比较容易在体内展开，可以将转基因小鼠 $CD8^+$ T 细胞过继给受体鼠进行研究，或者直接采用病毒或细菌感染诱导 $CD8^+$ T 细胞免疫反应。尽管如此，$CD8^+$ T 细胞的体外免疫反应

仍然是一个较好的实验模型，本方法拟介绍 $OVA_{257\text{-}264}$ 抗原肽特异性的 $CD8^+$ T 细胞的体外免疫反应的诱导与检测方法。

其优缺点基本与上述的 $CD4^+$ T 淋巴细胞反应相似，除此之外，本方法还可用于诱导具有杀伤靶细胞功能的 CTL。

材料与试剂

OT-1 小鼠（C57BL/6J 背景，Jax 公司，雌性，6～8 周龄，SPF 级别）
C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）
CD8-FITC
7-AAD
直径 3μm PE 标记的微珠
抗 CD16/32 抗体
400μmol/L 的 $OVA_{257\text{-}264}$ 抗原肽
检测细胞活化用的荧光标记抗体（CD25-PE、CD69-PE 与 CD44-PE）
96 孔圆底培养板
流式细胞仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤

1）OT-1 $CD8^+$ T 细胞的制备：取 OT-1 小鼠的脾脏制备成单细胞悬液，采用磁珠分选获得 CD8 阳性细胞（详见本章第二节），然后采用含 10％FBS 的 RPMI-1640 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml，在 96 孔圆底板每孔中加入 50μl 的细胞（5×10^4 个/孔），每组设 3 个复孔。

2）抗原提呈细胞的制备：可选用的抗原提呈细胞主要有两种，即经射线照射或采用丝裂霉素 C 处理过的且剔除 T 细胞的 C57BL/6J 小鼠脾脏细胞悬液，或者经培养的 C57BL/6J 小鼠骨髓来源成熟树突状细胞。若为前者，则将抗原提呈细胞的浓度调为 1×10^6 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入 50μl 的抗原提呈细胞（抗原提呈细胞：OT-1 $CD8^+$ T 细胞的比例为 1∶1）。若为后者，则将抗原提呈细胞的浓度调为 1×10^5 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入 50μl 的抗原提呈细胞（抗原提呈细胞：OT-1 $CD8^+$ T 细胞的比例为 1∶10）。同时设置 OT-1 $CD8^+$ T 细胞与抗原提呈细胞单独培养的对照组各 3 孔。

3）制备浓度为 800nmol/L 的 $OVA_{257\text{-}264}$ 液，往各孔里加入 50μl 使其终浓度为 200nmol/L。

4）采用含 10％ FBS 的 RPMI-1640 将各孔总体积均补至 200μl，混匀后将 96 孔板置于 37℃，5％ CO_2 的细胞培养箱中培养 3d。

5）在培养终止时，采用［^{3}H］胸腺嘧啶掺入法或者流式细胞仪计数法检测 $CD8^+$ T 细胞的增殖情况（可参见本章第五节）；小心收集上清以备 ELISA 检测细胞因子分泌情况用（如 IL-2、IFN-γ 与 TNF-α）；可通过流式检测 CD25、CD44 与 CD69 来检测细胞活化情况，以及细胞因子胞内染色分析单个细胞水平的细胞因子分泌情况；还可通过检测颗粒酶 B、穿孔素的表达情况，以及杀伤靶细

胞的功能。通过这些方法可以评估免疫反应中 $CD8^+$ T 细胞的功能状态。

注意事项

1）为明确抗原特异性，最好设置相应的对照抗原（如 LCMV gp_{33-41}）的对照组别，即加入对照抗原后 $CD8^+$ T 细胞不会出现活化与增殖。

2）由于 $CD8^+$ T 细胞的增殖明显强于 $CD4^+$ T 细胞，因此可以适当减少反应细胞的数量，以避免由于细胞增殖过旺而导致营养不足引起的细胞死亡。

第七节　混合淋巴细胞反应

混合淋巴细胞反应（MLR）常用于器官移植前的组织配型，以测定受体和供体主要组织相容性抗原（HLA 抗原）相容的程度。两个无关个体功能正常的淋巴细胞在体外混合培养时，由于 HLAⅡ类抗原不同，可相互刺激对方的 T 细胞发生增殖，此为双向混合淋巴细胞培养（two way MLR）；若将其中一方的淋巴细胞先用丝裂霉素 C 处理或 γ 射线照射使细胞中 DNA 失去复制能力，但仍能刺激另一方淋巴细胞发生转化，称为单向混合淋巴细胞培养（one way MLR）。可通过细胞数量、形态检查或 ^{3}H-TdR 掺入率检测反应细胞的增殖水平，两个个体间 HLA 抗原差异程度越大，反应越强烈。其中同位素标记法较为客观，重复性好且结果较准确。

由于 MLR 中淋巴细胞接受同种异型抗原的刺激而发生活化、增殖，产生种类众多的细胞因子，促进 NK、LAK 和 CTL 等杀伤细胞的分化，因此又是免疫调节研究中常用的实验模型。

一、单向混合淋巴细胞反应

在双向混合淋巴细胞反应的基础上，将刺激的一方淋巴细胞先用丝裂霉素 C 或放射线照射处理，使该细胞失去增殖能力，但仍保持刺激对方淋巴细胞增殖的试验称为单向 MLR。MLR 反应可通过 ^{3}H-TdR 掺入法或 MTT 法等方法检测。

MLR 主要用于移植前组织配型，以测定供、受者间组织相容性抗原的相容程度。也可用于移植后急性排斥反应的监测指标和 HLA、H-2Ⅱ类抗原的分型等研究；在研究淋巴细胞功能和免疫调节中也有广泛应用。

材料与试剂

人外周血淋巴细胞

RPMI-1640 培养液（100ml）

丝裂霉素 C：用完全培养基配成 0.5mg/ml 溶液

^{3}H-TdR：用生理盐水稀释为 50μCi/ml，4℃存放

闪烁液

步骤

1）将 A、B 两个体的淋巴细胞悬液分别做记号，以个体 A 的作为 MLR 的反应细

胞，个体 B 的作为 MLR 的刺激细胞。

2）刺激细胞处理：向个体 B 刺激细胞中加入 0.5mg/ml 的丝裂霉素 C，使其终浓度为 25μg/ml 细胞悬液，置 37℃水浴 30min，离心弃上清，沉淀细胞用培养液洗 1 次，调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml；个体 A 的细胞也取一部分做同样处理，作为自体反应对照组的刺激细胞。细胞也可以用 2000rad 射线照射灭活。

3）用微量加样器各取 0.1ml 反应细胞（A）和刺激细胞（B）于一圆底细胞培养板的孔中（A+B），同时，设自身对照组（A+A）和空白对照组（A）。置 37℃，5%CO_2 培养箱内培养 5～7d。

4）在培养终止前 6h 或者 18h，用同位素微量加样器于每孔内加入 50μCi/ml 的^{3}H-TdR 20μl（每孔 1.0μCi）。空白对照组不加同位素。

5）样品处理：用细胞收集仪收集、洗涤、裂解细胞，并将 DNA 转移至滤纸上。每列细胞洗涤吸引至少 10 次，以确保细胞 DNA 被充分转移，且彻底洗掉未渗入的^{3}H-TdR。100%甲醇洗涤滤纸条，使滤纸条易于干燥。将滤片置 60℃烘箱中烤干，冷却后将滤片放入含闪烁液的测量杯中，用 β 液闪仪检测放射强度。空白对照在样品处理前加入同位素，处理方法同实验组。

6）实验结果计算：以每分钟脉冲数（counts per minute，cpm）表示。所有样品在数据处理前，均应减去空白对照组的 cpm 值。MLR 反应强度通常以样品的 cpm 值或刺激指数（stimulation index，SI）表示；也可用 cpm 净值表示：

SI＝(实验组 cpm－空白对照组 cpm)/(对照组 cpm－空白对照组 cpm)

cpm 净值＝(实验组 cpm－空白对照组 cpm)－(对照组 cpm－空白对照组 cpm)

注意事项

1）刺激细胞与反应细胞的浓度，一般采用 1∶1 或 2∶1。

2）培养时间一般为 5～6d，^{3}H-TdR 掺入时间一般为终止培养前 15～16h。

3）细胞培养板以圆底为好。

4）试验时应注意无菌操作。

5）用两个无血缘关系个体的淋巴细胞做试验，阳性反应明显。

6）所用器材，应按同位素操作的有关规定处理。

二、双向混合淋巴细胞反应

双向混合淋巴细胞反应是来源于两个个体的淋巴细胞在体外混合培养时，由于细胞表面 HLAⅡ类抗原型别不同，可相互刺激对方淋巴细胞转化（称为双向 MLR），并产生多种淋巴因子，促进 NK、CTL、LAK 等杀伤细胞活性。

阳性反应提示两个个体的 HLA 抗原特异性不一致。在无血缘关系个体间 MLR 常为阳性。阴性反应提示两个个体的 HLA 抗原特异性一致，在同卵双生子间 MLR 为阴性。操作流程与单向混合淋巴细胞反应一样，只是刺激细胞不必用丝裂霉素 C 处理灭活。各组细胞加样见图 4-3。

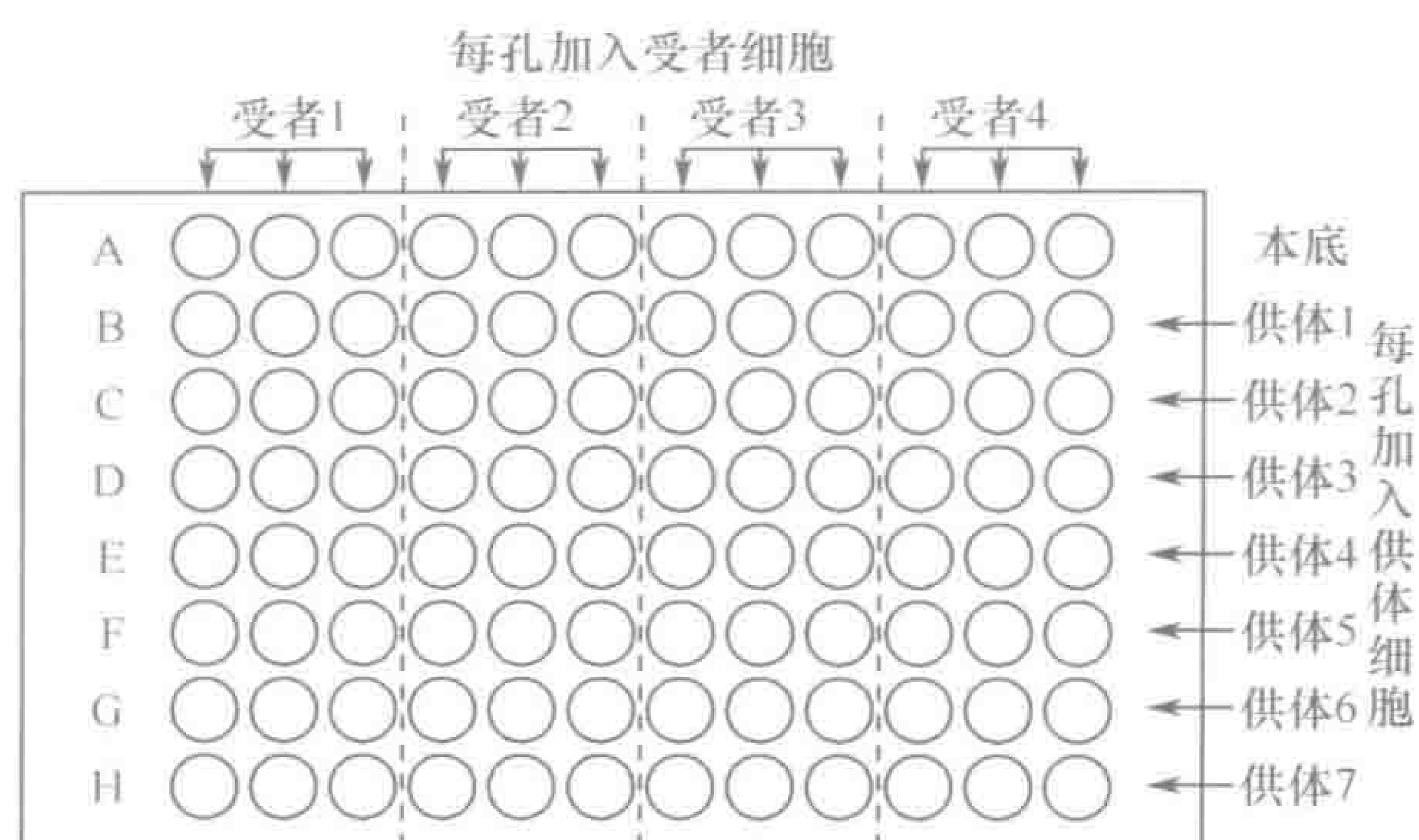


图 4-3　双向混合淋巴细胞反应流程图

第八节　CTL 杀伤实验

杀伤靶细胞是 $CD8^+$ 杀伤性 T 细胞（CTL）的主要功能，CTL 通过 TCR 识别靶细胞表面的抗原肽——MHC 分子复合物，在其他黏附分子等参与下，与靶细胞紧密接触，通过两种机制杀伤靶细胞。①细胞裂解：活化后的 CTL 通过胞吐作用释放穿孔素（perforin），后者插入靶细胞膜内形成空心管道出现小孔，水分通过小孔进入细胞质，导致靶细胞胀裂而死亡。②细胞凋亡：又分为两种方式，一种为活化后的 CTL 通过释放颗粒酶（granzyme），后者进入靶细胞，通过一系列酶的级联反应，最终激活靶细胞内源型 DNA 内切酶而导致靶细胞凋亡；另一种为受体介导，活化后的 CTL 大量表达 FasL（配体），与靶细胞表面 Fas（受体）结合，通过一系列酶的级联反应，最终激活靶细胞内源型 DNA 内切酶而导致靶细胞凋亡。

CTL 杀伤活性检测方法大体上可分为体内和体外检测。体外检测以经典的 ^{51}Cr 为标准方案，另外有 LDH 释放法等，近年来随着流式细胞技术的发展，产生了以流式细胞仪检测杀伤活性的 AnnexinV/PI 法。体内检测主要是用不同浓度 CFSE 标记靶细胞和非靶细胞，过继回输至体内后，检测两种细胞比例来反映靶细胞的杀伤结果。

一、^{51}Cr 释放法

^{51}Cr 释放实验是体外检测细胞毒活性的金标准，其基本原理为：将待检效应细胞（CTL）与铬酸钠 $Na_2{}^{51}CrO_4$ 标记的靶细胞一起培养。$Na_2{}^{51}CrO_4$ 可以进入到细胞内，与细胞质蛋白牢固地结合。若待检效应细胞能杀伤靶细胞，则 ^{51}Cr 从靶细胞内释放至培养液中，吸取上清，液闪仪读取的 ^{51}Cr 放射性脉冲数则反映效应细胞的杀伤活性。

本法结果准确、重复性好，但敏感性较低，且使用放射性的 ^{51}Cr 不利于安全操作及废物处置，还需特殊测定仪器；另外，^{51}Cr 半衰期（27.8d）也无法用于需多次测定的动物试验。

材料与试剂

RPMI-1640 完全培养液

靶细胞：EL4 肿瘤细胞

约 1mCi/ml $Na_2{}^{51}CrO_4$ 的等渗溶液，灭菌并不含致热源

2%（体积比）Triton X-100

^{51}Cr 计数管，96 孔圆底培养板

步骤

1）用 RPMI-1640 培养液洗涤 10^7 个靶细胞 EL4，去上清。用 0.5ml 不含碳酸氢钠的完全培养液悬浮细胞。加入 100μCi/ml 的 $Na_2{}^{51}CrO_4$，37℃水浴中标记 1h，每 5～10min 摇晃 1 次，混匀细胞。

2）用 RPMI-1640 培养液洗涤细胞 3 次，每次 400g 离心 10min。用 50ml RPMI-1640 培养液悬浮细胞，置 37℃水浴 30min，以减少非特异的自然释放。

3）200g 离心 10min，去上清。小心使用 RPMI-1640 培养液悬浮细胞，尽量减少振荡引起的细胞损伤以降低靶细胞的自然释放率，将细胞浓度调整为 10^4～10^6 个/ml 备用。

4）在 96 孔圆底细胞培养板中加入 ^{51}Cr 标记的靶细胞，每孔加 100μl。

5）向各孔加 100μl 效应细胞，效应细胞与靶细胞的比例（效靶比，E∶T）根据要求而定，通常为 5∶1～50∶1。阴性对照孔（自然释放）不加效应细胞只加 100μl 完全培养液，阳性对照孔（最大释放）中加 100μl 2%的 Triton X-100。每个实验设置 3 个复孔（详细加样见图 4-4）。

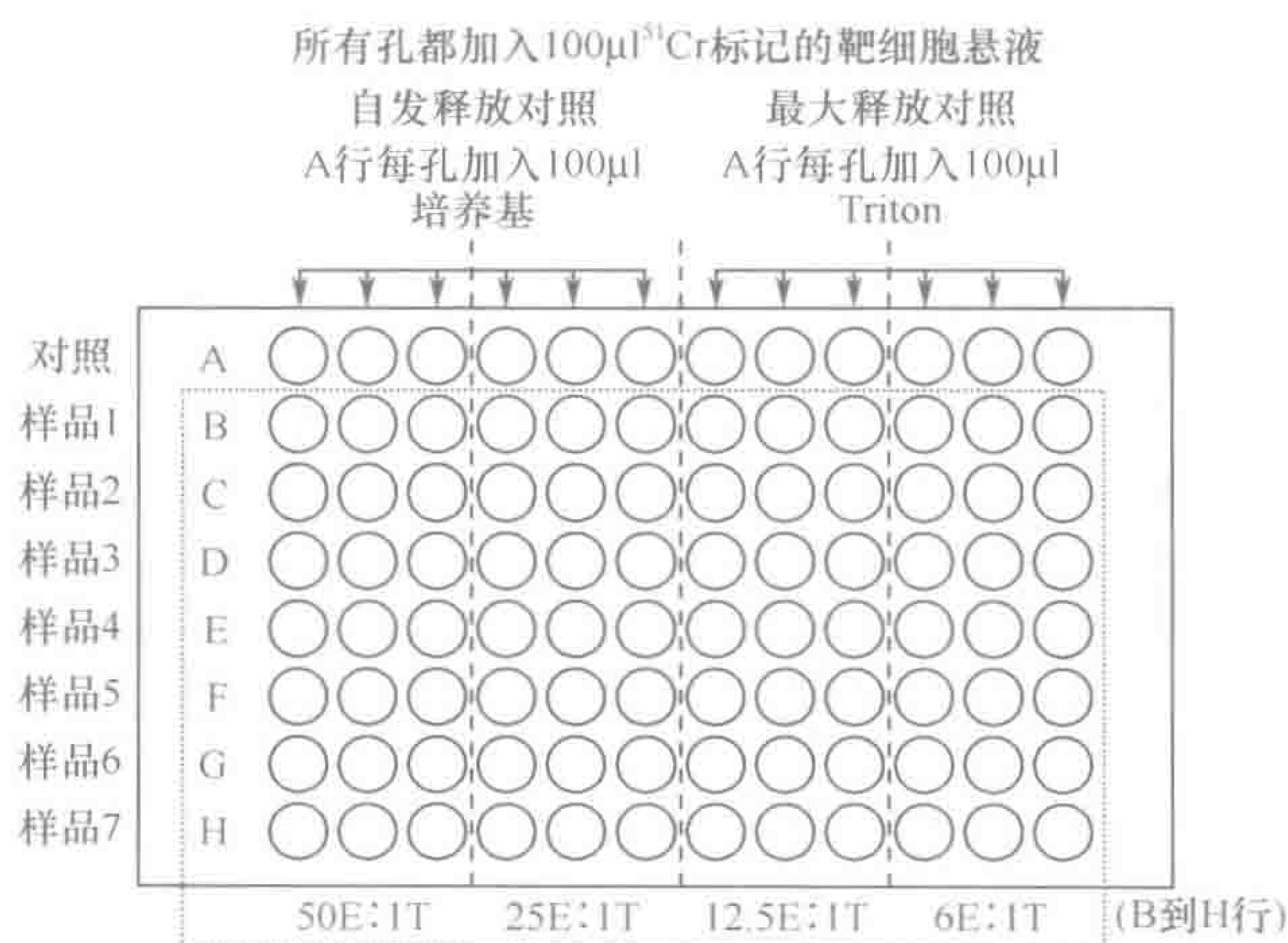


图 4-4　^{51}Cr 释放法检测 CTL 杀伤功能流程图

6）稍稍离心（200g，30s）后，置 37℃，5% CO_2 的培养箱中培养 4h。

7）200g 离心培养板 5min，每孔吸出 100μl 上清置一次性使用的检测管中，在 γ 液闪仪测定上清中的每分钟放射性活性（cpm 值）。

8）特异性杀伤活性的计算。用细胞毒性百分比表示：细胞毒性（%）=[（实验组 cpm－自然释放组 cpm）/（最大释放组 cpm－自然释放组 cpm）]×100。

注意事项

1）靶细胞可以是适当 MHC 表型的组织培养细胞或者肿瘤细胞，如 P815（H-2d）、

EL4（H-2b）、LK（H-2K）等，可从ATCC获得。

2）靶细胞应该在使用前用台盼蓝拒染法测定活细胞数，至少大于80%的活细胞比例才可以用于实验。必要时可以采用Ficoll-Hypaque密度梯度离心纯化活细胞。

3）^{51}Cr标记肿瘤细胞需要1～2h，淋巴细胞只需要45min。孵育期间轻轻混匀细胞可以提高标记效果。

4）每孔的细胞浓度大于2×10^6个时会影响CTL的杀伤活性。

5）实验中自发释放率应小于10%。

6）效应细胞也可以是从小鼠新鲜分离的细胞。当效应细胞为某单一抗原特异性时，如OVA，靶细胞为包被了OVA多肽的EL4，此时应该设置未包被多肽的EL4细胞或者无关抗原包被的EL4作为对照。

7）杀伤时间取决于实验目的、效应细胞的活力，以及靶细胞的敏感性，一般3～6h，也可以培养过夜。

8）操作^{51}Cr和其标记的细胞时应遵守标准放射安全操作规范。

二、LDH释放法

乳酸脱氢酶（LDH）在活细胞胞质内含量丰富，正常情况下不能通过细胞膜。当细胞受损伤或死亡时，细胞膜通透性改变，此时可释放到细胞外，细胞培养液中LDH活性与细胞死亡数目成正比。加入LDH底物，用比色法测定并与靶细胞对照孔LDH活性比较，可计算效应细胞对靶细胞的杀伤率。本法操作简便快捷，自然释放率低，可用于CTL及NK细胞活性测定及药物、化学物质或放射引起的细胞毒性，现已有LDH法测定CTL活性试剂盒（Promega）。

材料与试剂

RPMI-1640完全培养液，2%（体积比）Triton X-100

LDH底物溶液，1mol/L柠檬酸终止液

P815靶细胞（系DBA/2小鼠的肥大细胞瘤细胞株）

酶标仪，CO_2细胞培养箱

步骤

1. 效应细胞的制备

P815靶细胞足垫免疫小鼠7d后，于无菌条件下取出引流的腹股沟淋巴结，100目钢网研磨，调整细胞浓度为2×10^7个/ml。台盼蓝染色要求存活率大于95%。

2. 靶细胞的制备

P815细胞株，连续传代培养，调整细胞浓度为2×10^5个/ml，台盼蓝染色成活率大于95%。

3. LDH释放法测定CTL的功能

按表1加样于96孔培养板中，设3个复孔。混匀置二氧化碳培养箱中孵育4h。室

温离心，用微量加样器每孔取上清 100μl，加于另一培养板孔中，37℃预热 10min，每孔加入新鲜配置的底物溶液 0.1ml，避光，室温反应 15min，每孔加入 1mol/L 终止液，酶标仪在 570nm 处读取每孔 OD 值（详细加样见表 4-1）。

表 4-1　LDH 释放法测定 CTL 活性的加样情况分组

分组	效应细胞/μl	靶细胞/μl	Triton X-100/μl	完全培养基/μl
自然释放孔		100		100
最大释放孔		100	100	
实验孔 1（100∶1）	100	100		
实验孔 2（50∶1）	50	100		50
实验孔 3（20∶1）	20	100		80

4. 计算 CTL 活性

特异杀伤率(%)=(实验孔 LDH 值－自然释放孔 LDH 值)/(最大释放孔 LDH 值－自然释放 LDH 值)×100。

三、流式细胞标记法

由于^{51}Cr 释放法的多项缺点，多年来人们一直试图寻找可以替代^{51}Cr 释放法的 CTL 活性测定方法，流式细胞术即为一种灵敏可靠、简单易行的非同位素测定法，有着极大的发展空间。

正常细胞的磷酯酰丝氨（phosphatidylserine，PS）位于细胞膜内表面，细胞凋亡时翻转露于膜外侧，可与 AnnexinV 高亲和力结合。该实验基本原理：首先用 OVA 免疫小鼠，7d 后小鼠体内形成 OVA 特异性的 CTL 细胞，此时分离小鼠脾脏 $CD8^{+}$ T 细胞作为效应细胞。以 OVA 的 CTL 表位多肽 $OVA_{257\text{-}264}$ 包被 EL4 细胞制成的 EL4-OVA 为靶细胞。将效应细胞与靶细胞充分共育，CTL 的 TCR 识别 MHC-Ⅰ-$OVA_{257\text{-}264}$ 表位，启动杀伤程序，导致靶细胞的死亡，PS 外翻，用 anti-CD8 PE 标记效应细胞（不能与 PE-mAb 结合的细胞即为靶细胞），再用 AnnexinV-FITC 标记凋亡靶细胞，用流式细胞仪区分并定量 3 类不同的细胞群（效应细胞为 $CD8^{+}$；活的靶细胞为 $CD8^{-}$ $AnnexinV^{-}$；死亡的靶细胞为 $CD8^{-}$ $AnnexinV^{+}$），即可计算出效应细胞杀伤靶细胞百分数。此外，也有用 CFSE 标记靶细胞，用 PI 标记死亡细胞进行流式检测的。

本法简单快捷，无需预标记，可以取代放射性物质标记，可以减少潜在的放射性危害；且与^{51}Cr 法相关性好，重复性也较好，可以提供连续的可比较的结果。

材料与试剂

OVA 全蛋白

$OVA_{257\text{-}264}$ 多肽

弗氏完全佐剂

anti-CD8 PE

AnnexinV-FITC 荧光抗体

RPMI-1640 完全培养基

靶细胞：EL4淋巴瘤细胞

步骤

1. 效应细胞（T）的制备

OVA与弗氏完全佐剂皮下免疫C57BL/6小鼠，7d后取C57BL/6J小鼠脾脏，分离得到单细胞悬液。

2. 靶细胞（E）的制备

EL4靶细胞，加入$OVA_{257\text{-}264}$多肽2μmol/L，37℃，5%CO_2细胞培养箱中孵育1h，洗去上清，调整浓度为10^5个/ml。另外取不加入OVA多肽的EL4细胞，同样调整细胞浓度为10^5个/ml，作为对照组。

3. 杀伤实验

取靶细胞悬液100μl，加入96孔圆底板，依照不同效靶比加入效应细胞，使E∶T达到相应的6.25∶1、12.5∶1、25∶1；50∶1，37℃，5%CO_2条件下培养6h。

4. 凋亡检测

取出培养细胞，加入CD8和AnnexinV荧光抗体标记，10min后离心重悬浮，流式分析。其特异性杀伤能力＝实验组$CD8^-$ $AnnexinV^+$阳性细胞占$CD8^-$细胞比例－对照组$CD8^-$ $AnnexinV^+$阳性细胞占$CD8^-$细胞比例。

注意事项

1）一定要选择好效应细胞，免疫时间过短不能够形成效应T细胞，而如果时间过长的话，效应细胞进入收缩期，大量地丢失，也不能够很好地完成实验。

2）对照组未包被多肽的淋巴瘤细胞可消除非特异性杀伤和自然死亡对结果的影响。

3）靶细胞的自然死亡率低，并可设置多个效靶比、多个时间点，故此方法能够敏感、定量和客观地检测细胞介导的细胞毒。

4）杀伤时间取决于实验目的、效应细胞的活力，以及靶细胞的敏感性，一般3～6h，也可以培养过夜。

5）根据细胞大小有时候也能够分辨出靶细胞和效应细胞。

四、体内杀伤实验

以上所有CTL杀伤活性的检测都是在体外进行的，而体内又是怎样的情况呢？近年来，在过继回输靶细胞的基础上，结合CFSE标记和流式细胞术检测技术，建立了一种可以更加科学合理地评价体内CTL杀伤活性的实验方法。该方法更能真实反映体内情况，必将在各项研究，包括肿瘤免疫和移植排斥中，得到更广阔的应用。

体内杀伤实验的基本原理：采用含CTL表位肽的蛋白质免疫小鼠，激发抗原特异性的CTL。然后我们用未免疫小鼠自身的脾脏淋巴细胞孵育同样的CTL表位肽，使其成为靶细胞，并将该靶细胞标记上高浓度的CFSE。对照细胞采用自身的不孵育CTL表位肽的脾脏淋巴细胞，并将该细胞标记上低浓度的CFSE。两群细胞以1∶1混合后尾静脉回输到免疫后小鼠，其体内预先活化的CTL效应细胞必将对结合了CTL表位肽

的靶细胞产生特异性杀伤效应，而对未结合 CTL 表位肽的细胞不产生杀伤效应。16h 后，分离小鼠脾脏淋巴细胞，用流式细胞术分析两群不同荧光强度 CFSE 的细胞数，计算高浓度 CFSE 的靶细胞与标记低浓度 CFSE 的细胞数之比，可以客观反映体内靶细胞的存活率，也就是相应体内 CTL 对靶细胞的杀伤率。

材料与试剂

H2-k^b 限制性 CTL 表位肽 $OVA_{257-264}$

弗氏完全佐剂

CFSE（Molecular Probe 公司）

流式细胞仪

步骤

1. 动物免疫

分别用含 $OVA_{257-264}$ 的弗氏完全佐剂皮下免疫小鼠。免疫剂量为每只小鼠 250μg，背侧尾根部皮下注射 3 次，间隔 1 周。

2. 靶细胞制备与标记

1）颈椎脱臼法处死小鼠，无菌分离小鼠脾脏，碾磨通过 200 目的无菌铜网，收集悬液用红细胞溶解液去除红细胞，用 RPMI-1640 培养液重悬，计数。

2）靶细胞的标记调整小鼠脾脏淋巴细胞数为 1×10^7 个/ml，37℃，5%CO_2 条件下孵育终浓度为 2μg/ml 的 $OVA_{257-264}$ 1h。洗涤后，再用终浓度为 5μmol/ml 的 CFSE 于同样条件下标记 10min。洗 3 次去除残余的染料，并悬浮于完全培养基中。对照组直接采用正常小鼠脾脏淋巴细胞（不与 $OVA_{257-264}$ 共孵育），用终浓度为 0.5μmol/ml 的 CFSE 于同样条件下标记。

3. 靶细胞的回输与检测

1×10^7 个靶细胞与 1×10^7 个对照组细胞等比混合，尾静脉分别回输给 OVA 免疫小鼠和未免疫小鼠。16h 后颈椎脱臼法处死小鼠，无菌分离脾脏淋巴细胞，流式细胞仪检测，相应细胞毒杀伤率可由公式：杀伤率（%）＝（1－$CFSE^{high}$ 细胞数/$CFSE^{low}$ 细胞数）×100%计算得出。

注意事项

1）CFSE 对细胞存在一定毒性，应彻底洗尽清除。

2）对照组未免疫小鼠用来排除非特异性作用，其杀伤率应该为 0。故也有实验中可以不设置该组对照。

第九节 调节性 T 细胞的分离、诱导分化与功能检测

调节性 T 细胞（regulatory T cell，Treg）是由日本科学家 Shimon Sakaguchi 及其研究小组于 1995 年首次发现的，该研究小组当时发现正常未免疫小鼠外周 $CD4^+$ T 细

胞中大约10%的细胞表达细胞活化标志CD25，这些表达CD25的细胞在维持自我耐受中发挥重要作用，并可预防与阻止自身免疫性疾病的发生发展。这群细胞随后被定义为调节性$CD4^+$ T细胞。近15年来，人们对Treg的研究已经取得了飞速的进展，对其亚群、特征性标志、分化发育、功能及其免疫调节的作用机制等方面已经展开了非常深入的研究，人们也对Treg在自身免疫性疾病、移植排斥、肿瘤防治等临床实践中的应用进行了有益的尝试，并显示了良好的前景。

目前人们所指的Treg主要是$CD4^+$ Treg。Treg的主要特征是组成性表达CD25、CTLA4与转录因子Foxp3，其中Foxp3在Treg的分化发育及其抑制功能的维持上发挥重要作用，而近年来研究发现CTLA4对Treg发挥抑制功能起着非常重要的作用，而且CTLA4的表达依赖于Foxp3。Treg可在胸腺中发育成功能成熟的T细胞亚群，普遍称为自然产生的Treg（naturally arising Treg，nTreg），另外，在外周，Treg也能在初始T细胞活化过程中，在TGF-β存在的条件下诱导产生，称为诱导产生的Treg（inducible Treg，iTreg）。Treg在维持对自身抗原的免疫耐受中以及抑制过度免疫反应中发挥着至关重要的作用。

本节拟介绍Treg研究的常用技术方法，主要有Treg的分离纯化、体外诱导分化，以及抑制功能的检测。

一、Treg的分离纯化

由于CD25是Treg重要的表面标志，因此人们分离纯化Treg主要基于CD4与CD25这两个表面标志，而且主要用于分离纯化自然产生的Treg。常用的Treg的分离纯化方式有两种，第一种是运用流式细胞仪的分选技术，基于荧光抗体标记技术；第二种是利用磁珠分选技术，基于免疫磁珠标记技术，有一些商品化的Treg分离纯化试剂盒（如Miltenyi公司的Treg分离纯化试剂盒）。前者所获得的细胞相对较纯，但限于需要专门的流式细胞分选仪，一般的实验室难以开展；后者虽说纯度不如前者，但基本能够满足一般实验的需求，而且方便开展。

这里主要介绍采用磁珠分选技术来分离纯化小鼠Treg的方法。具体的方法为，先采用阴选CD4的方法获得$CD4^+$细胞，再采用阳选CD25的方法获得$CD25^+$的细胞，即为$CD4^+CD25^+$的Treg细胞。

材料与试剂

C57BL/6J小鼠（雌性，6～8周龄，SPF级别）
小鼠$CD4^+$ T细胞分离试剂盒（Miltenyi公司）
CD25-PE（Miltenyi公司）
抗PE磁珠（Miltenyi公司）
PBS，pH7.4
MACS缓冲液（含0.5% BSA，2mmol/L EDTA的PBS，pH7.2）
含10%FBS的RPMI-1640完全培养基
LD与LS分选柱（Miltenyi公司）
MidiMACS分选器（Miltenyi公司）

步骤

1）取 C57BL/6J 小鼠脾脏或淋巴结并制备成单细胞悬液，采用小鼠 $CD4^+$ T 细胞分离试剂盒标记细胞后过 LD 分选柱，阴选获得 CD4 阳性细胞。

2）加入 PBS，4℃下 300*g* 离心 5min 后，去上清加入 CD25-PE，4℃标记 15min。

3）加入 PBS，4℃下 300*g* 离心 5min 后，去上清加入抗 PE 磁珠，4℃标记 15min。

4）在标记时将一支 LS 分选柱放在 MidiMACS 分离磁铁上，用 MACS 缓冲液每次 3ml 洗 3 遍 LS 分选柱。弃洗脱液，在分选柱下方放置一支新的 15ml 离心管。

5）加入 PBS，4℃下 300*g* 离心 5min 后，去上清，用 MACS 缓冲液混悬细胞使其浓度达 10^8 个细胞/ml。

6）将细胞通过 40μm 尼龙网，并用 0.1～0.4ml MACS 缓冲液冲洗滤网。

7）将细胞悬液加到 LS 分选柱中。

8）用 MACS 缓冲液每次 3ml 冲洗分选柱共 3 次。第一个 3ml 应缓慢加入以免扰动分选柱中的细胞。将洗脱液作为阴性细胞（$CD4^+CD25^-$ 细胞）保存（可当做初始 $CD4^+$ T 细胞用于 Treg 的体外诱导分化）。

9）将分选柱从磁体上取下。在分离柱中加入 5ml MACS 缓冲液。将活塞塞进分离柱并洗脱阳性细胞（$CD4^+CD25^+$ 细胞）。

10）加入 PBS，将细胞在 4℃下 300*g* 离心 5min。将 $CD25^+$ 细胞用 1～2ml 完全 RPMI-1640 培养基混悬。将 $CD25^-$ 细胞用 10ml 完全 RPMI-1640 培养基混悬。计数备用。

注意事项

1）在将细胞悬液加入到分选柱前务必采用 40μm 尼龙网过滤，以免细胞团块堵住分选柱而影响分选效果。

2）在 CD25-PE 标记后应洗涤细胞，以免影响抗 PE 磁珠的标记效果。

二、Treg 的体外诱导分化

体内对 Treg 的研究受限于不能得到大量的 Treg。自然产生的 Treg 约占外周 $CD4^+$ T 细胞的 10%，而且 nTreg 在体外也不能通过 TCR 刺激扩增。近年来，研究发现 Treg 细胞可以通过将初始 T 细胞活化并在 TGF-β1 存在的情况下诱导产生。这样产生的 Treg 称为诱导产生的 Treg（iTreg），它能够表达 Treg 的表面标志 CD25，也能表达 Foxp3。从功能上来说，iTreg 能够在体外抑制初始 T 细胞的活化与增殖，体内实验也表明在不同的动物模型中，这些细胞能够抑制炎症的发生与下调免疫应答强度。这里主要介绍一种能在体外大量产生 iTreg 的方法。

这种方法可以产生大量的能用于研究的 Treg，并且可以在 5d 内完成，耗费时间较少。

材料与试剂

C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）

含 10%FBS 的 RPMI-1640 完全培养基

抗 CD3 单抗
抗 CD28 单抗
重组的人 TGF-β1
可检测三色或四色的流式细胞仪

步骤

1）取 C57BL/6J 小鼠脾脏制备成单个核细胞，按照 Treg 的分离纯化方法获得 $CD4^{+}CD25^{-}$ 的初始 $CD4^{+}$ T 细胞，即先采用阴选 CD4 的方法获得 $CD4^{+}$ 细胞，再采用阳选 CD25 的方法去除 $CD25^{+}$ 的细胞，最终获得 $CD4^{+}CD25^{-}$ 的初始 $CD4^{+}$ T 细胞。
2）Treg 的诱导。①用 10μg/ml 溶于 PBS 的抗 CD3 单抗在 37℃下包被 24 孔板 2h，在铺细胞前用 PBS 洗板一次；②将 1ml 溶于 RPMI-1640 完全培养基的 2×10^{6} 个 $CD4^{+}CD25^{-}$ 细胞加入包被了抗 CD3 单抗的培养板，然后迅速加入抗 CD28 抗体（2μg/ml）和 TGF-β1（5ng/ml），孵育细胞 5d。
3）Treg 诱导分化效果的定量与定性检测。①在蛋白质水平可以用流式细胞术检测 CD25 与 Foxp3 的表达情况及阳性细胞的比例；②在 RNA 水平可以采用 real-time PCR 检测 Foxp3 的表达情况。

注意事项

1）不同品系来源的小鼠的 $CD4^{+}CD25^{-}$ T 细胞诱导 Treg 时，产出的 Foxp3 阳性细胞的比率可能有所差别，如果产出率较低时，可以在体系中加入 20ng/ml 的鼠 IL-2，可以增加 Foxp3 阳性细胞的产出率和存活率。
2）可以在诱导 5d 之后，通过阳选 CD25 以提高所获得的 Treg 细胞的纯度。

三、Treg 的功能检测

Treg 的功能检测主要是检测其体外抑制初始 $CD4^{+}$ T 细胞活化与增殖的能力。由于 Treg 既可以抑制非特异性活化的初始 $CD4^{+}$ T 细胞的增殖，也可以抑制同种异型抗原反应性的初始 $CD4^{+}$ T 细胞的增殖。因此，这里介绍 Treg 抑制初始 $CD4^{+}CD25^{-}$ T 细胞非特异性增殖（以可溶性抗 CD3 单抗联合抗原提呈细胞的非特异性 T 细胞反应为例）与抑制同种异型抗原特异性初始 $CD4^{+}CD25^{-}$ T 细胞增殖（以混合淋巴细胞反应为例）的检测方法。

（一）Treg 抑制 $CD4^{+}CD25^{-}$ T 细胞非特异性增殖的检测

材料与试剂

C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）
[^{3}H] 胸腺嘧啶
抗 CD3 单抗
β 液闪仪

步骤

1）初始 $CD4^+$ T 细胞与 Treg 的制备：取 C57BL/6J 小鼠脾脏并制备成单细胞悬液，采用磁珠分选获得初始 $CD4^+CD25^-$ T 细胞与 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞，然后采用含 10%FBS 的 RPMI-1640 调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml。

2）抗原提呈细胞的制备：采用经射线照射或采用丝裂霉素 C 处理过的且剔除 T 细胞的 C57BL/6J 小鼠脾脏细胞悬液作为抗原提呈细胞，将抗原提呈细胞的浓度调为 2×10^6 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入 50μl 的抗原提呈细胞（抗原提呈细胞：初始 $CD4^+$ T 细胞的比例为 1∶1）。

3）每孔加 50μl $CD4^+CD25^-$ T 细胞至 96 孔圆底板（1×10^5/孔），每组设 3 个复孔。

4）每孔分别加 50μl 抗原提呈细胞与 50μl 浓度为 4μg/ml 的抗 CD3 单抗。

5）在 96 孔板的每孔中按 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞与初始 $CD4^+$ T 细胞的比例为 0∶1、1∶1、1∶2、1∶4、1∶8 加入 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞。同时设置各种细胞的单独培养的对照组、抗原提呈细胞与初始 $CD4^+$ T 细胞共培养组，以及抗原提呈细胞与 Treg 细胞共培养组各 3 孔。

6）采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 将各孔总体积均补至 200μl，混匀后将 96 孔板置于 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养 3d。

7）最后培养 6～8h，每孔加 [^{3}H] 胸腺嘧啶，用样品收集器收集细胞，并用 β 液闪仪测量 cpm 值。

注意事项

由于抗 CD3 单抗的浓度影响非特异性免疫应答的强度，而 Treg 的抑制功能情况也与应答强度密切相关，因此应该测试抗 CD3 单抗的最佳浓度以诱导合适的免疫应答强度，从而可以确实反映 Treg 的抑制功能。

（二）Treg 抑制同种异型抗原特异性 $CD4^+CD25^-$ T 细胞增殖的检测

材料与试剂

BALB/c 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）
C57BL/6J 小鼠（雌性，6～8 周龄，SPF 级别）
[^{3}H] 胸腺嘧啶
β 液闪仪
96 孔圆底培养板

步骤

1）BALB/c 初始 $CD4^+$ T 细胞与 BALB/c Treg 的制备：取 BALB/c 小鼠脾脏并制备成单细胞悬液，采用磁珠分选获得初始 $CD4^+CD25^-$ T 细胞与 $CD4^+CD25^+$ T 细胞，然后采用含 10%FBS 的 RPMI-1640 调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml。

2）刺激细胞的制备：采用经射线照射或采用丝裂霉素 C 处理过的且剔除 T 细胞的

C57BL/6J 小鼠脾脏细胞悬液作为刺激细胞，将刺激细胞的浓度调为 2×10^6 个/ml，在上述 96 孔板的每孔细胞中加入 50μl 的刺激细胞（刺激细胞：BALB/c 初始 $CD4^+$ T 细胞的比例为 1∶1）。

3）每孔加50μl $CD4^+CD25^-$ T 细胞至96孔圆底板（1×10^5个/孔），每组设3个复孔。

4）每孔分别加 50μl 刺激细胞。

5）在 96 孔板的每孔中按 BALB/c $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞与 BALB/c 初始 $CD4^+$ T 细胞的比例为 0∶1、1∶1、1∶2、1∶4、1∶8 加入 BALB/c $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞。同时设置各种细胞的单独培养的对照组、刺激细胞与 BALB/c 初始 $CD4^+$ T 细胞共培养组，以及刺激细胞与 Treg 细胞共培养组各 3 孔。

6）采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 将各孔总体积均补至 200μl，混匀后将 96 孔板置于 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养 3～5d。

7）培养最后 6～8h，每孔加 [^{3}H] 胸腺嘧啶，用样品收集器收集细胞，并用 β 液闪仪测量 cpm 值。

注意事项

为了明确 Treg 抑制功能的特异性，可以设置第三种品系来源（如 C3H 小鼠）的 Treg 的相应抑制组别，第三种品系来源的 Treg 应该对 C57BL/6J 来源的刺激细胞诱导的 BALB/c 初始 $CD4^+CD25^-$ T 细胞的增殖没有明显的抑制。

第十节 记忆性 T 细胞的研究方法

免疫记忆是获得性免疫应答的主要特征。机体对特异性抗原初次应答之后，所形成的效应信息可以存留在机体免疫系统，当同一抗原再次侵入机体，免疫系统可以产生比初次应答更为迅速、强烈、持久的反应，这就是免疫记忆。免疫记忆的物质基础主要是经抗原初次刺激后处于静息态的记忆性 T 细胞和记忆性 B 细胞，以及长期存活的浆细胞等。在这其中，记忆性 T 细胞尤为重要，是机体有效清除入侵病原体和预防接种的关键。

免疫记忆在体内可维持很长时间，也许是宿主的一生。免疫记忆能完全防止同一疾病的再次发生或减轻疾病的严重程度。所以，深入研究记忆性 T 细胞的分群、产生及维持，并据此开发新型疫苗，将是传染性疾病疫苗研发的重要目标和方向。由此可见，研究记忆性 T 细胞的产生机制是现在免疫学和疫苗学研究的热点之一。然而对于记忆性 T 细胞到底是如何形成的，是什么因素在其中起到决定性作用，目前还没有完全阐明。某些研究结果提示：记忆性 $CD8^+$ T 细胞的产生无需抗原的持续存在和 B 细胞的参与，但是需要 $CD4^+$ T 细胞的辅助；IL-7、IL-15 等细胞因子在记忆性 T 细胞的形成中发挥重要作用；T 细胞本身的一些内在蛋白质（如 T-bet、Bcl-2 等）对其记忆形成也非常关键。

记忆性 T 细胞的形成大体上可以分为三步。第一，T 细胞在抗原刺激下被激活，并不断增殖形成大量的效应性 T 细胞，以清除病原体。这个过程大概发生在接触抗原后的 7d 之内，称为活化增殖期。第二，随后，多于 90% 的效应性 T 细胞会发生死亡，

从而被机体清除。此阶段大概在抗原接触后的 2～4 周时间内完成，称为收缩期。第三，在经历了收缩期后存留下来的 T 细胞，进入内稳态增殖，在机体内维持一定的数目。这个过程发生在 4 周之后，可能维持数年，甚至伴随整个生命周期，称为记忆形成和维持期。目前对于记忆性 T 细胞的研究主要集中在 $CD8^+$ T 细胞，而 $CD4^+$ T 细胞由于增殖能力远远弱于 $CD8^+$ T 细胞，导致在机体内数目非常稀少，研究起来难度较大。本章主要以 $CD8^+$ T 细胞的记忆为例。

记忆性 T 细胞没有非常特异性的标记，但总体来说都是 CD44 高表达的。根据 CD62L 的表达又可以分为中枢记忆性 T 细胞（centery memory T cell，Tcm）和效应记忆性 T 细胞（effector memory T cell，Tem）。前者主要定位在淋巴器官（如脾脏、淋巴结等），增殖能力较强而杀伤效应较弱，后者则定位于外周组织（如皮肤、肺脏等），主要司杀伤功能，增殖能力则较弱。这些以表面分子标识的记忆性 T 细胞是多克隆的，是多种抗原特异性的记忆性 T 细胞的混合体，不利于进一步研究。而抗原特异性 T 细胞的标识目前来说主要有两种技术方法，一种是 MHC 分子四聚体标记技术，另外一种就是细胞因子胞内染色技术。从细胞因子分泌角度来看，一般认为在记忆形成后（接触抗原 4 周之后），抗原肽短时间（4～6h）刺激下能够分泌 IFN-γ 的 $CD8^+$ T 细胞为记忆性 $CD8^+$ T 细胞，分泌 IFN-γ 的 $CD4^+$ T 细胞为记忆性 Th1 细胞。使用不同的抗原多肽刺激，则标识出不同的抗原特异性 T 细胞。

目前对于记忆性 T 细胞的研究模型主要有以下 4 种，每种模型都有其固有的优点和缺陷：①记忆性表型细胞，CD44 高表达的一群 T 细胞被认为是记忆性表型的细胞，这群细胞在体内数量比较多，容易进行一些研究，但是我们并不知道这些细胞曾经历过怎样的激活过程；②体外活化的 TCR 转基因 T 细胞，此种方法也可以获得大量的效应性 T 细胞，用于体内过继回输，但是体外活化并不能真实模拟体内的活化过程；③体内活化的 TCR 转基因 T 细胞，此种方法抗原明确，也容易获取，但是过继回输时可能受到受体鼠的排斥，而且大量使用时表型异常，少量使用时则不易于检测；④特定抗原激活的内源性 T 细胞，此法抗原明确，能够真实反映机体的免疫状况，是最贴近事实的研究模型，但是其缺点是数目极少，难于监测。

一、流式胞内染色技术

应用流式细胞术检测细胞内细胞因子的表达情况，是近年来发展起来的一种新的检测方法。较传统方法（如免疫组织化学、免疫细胞化学、ELISPOT、原位杂交、有限稀释分析等），胞内染色法具有明显的优势，不仅特异性和敏感性高，而且可以简便、快速地对大量标本同时进行多参数分析。其基本原理就是利用记忆性 T 细胞在体外相应抗原短时间刺激下能够迅速分泌细胞因子 IFN-γ 的特性对其进行标识。

本实验所用的标本一般是人或小鼠的外周血或脾细胞。记忆性 T 细胞在体外并不能自发地分泌细胞因子，所以首先要对细胞进行刺激处理。在免疫记忆的研究中，多采用相应的抗原多肽对细胞进行预刺激，而在这过程中用细胞因子分泌阻断剂 BFA 阻断其分泌作用，使其间产生的细胞因子都能够保留在细胞内部，之后应用抗细胞因子和细胞表面标志的荧光抗体的多色流式细胞术，可以高效地检测细胞因子产生细胞的特性和

频率，也就是机体针对该种抗原表位存在的特异性T细胞的特征和频率。

在标记过程中，首先是进行细胞表面标志的染色，然后对细胞进行固定、破膜处理，最后用针对细胞内抗原的标记抗体进行胞内染色。细胞因子胞内染色依赖于预先对细胞进行固定、破膜处理。预先对细胞进行固定可以保持细胞形态和细胞表面的抗原，而且可以使细胞对随后的破膜过程产生耐受。破膜过程可以使荧光标记的细胞因子抗体穿过细胞膜和细胞器膜，与细胞因子进行特异性地结合，从而产生荧光信号，可通过流式细胞仪进行检测。

需要注意的一点是，抗原刺激后分泌IFN-γ的并不都是记忆性$CD8^+$ T细胞，也有可能是效应性T细胞，所以判断一个细胞是否为记忆性T细胞必须有个时间概念，一定要是抗原清除后，记忆性T细胞已经形成（免疫后至少4周）。图4-5为C57BL/6J小鼠在经过$OVA_{257\text{-}264}$免疫后一个月，分离获得小鼠脾脏细胞悬液，在体外加入$OVA_{257\text{-}264}$再刺激4～6h，随后采用细胞因子胞内染色的方法标记$CD8^+$ T细胞的IFN-γ的分泌情况，可以发现$CD8^+$ T细胞内存在一群分泌IFN-γ的记忆性细胞。

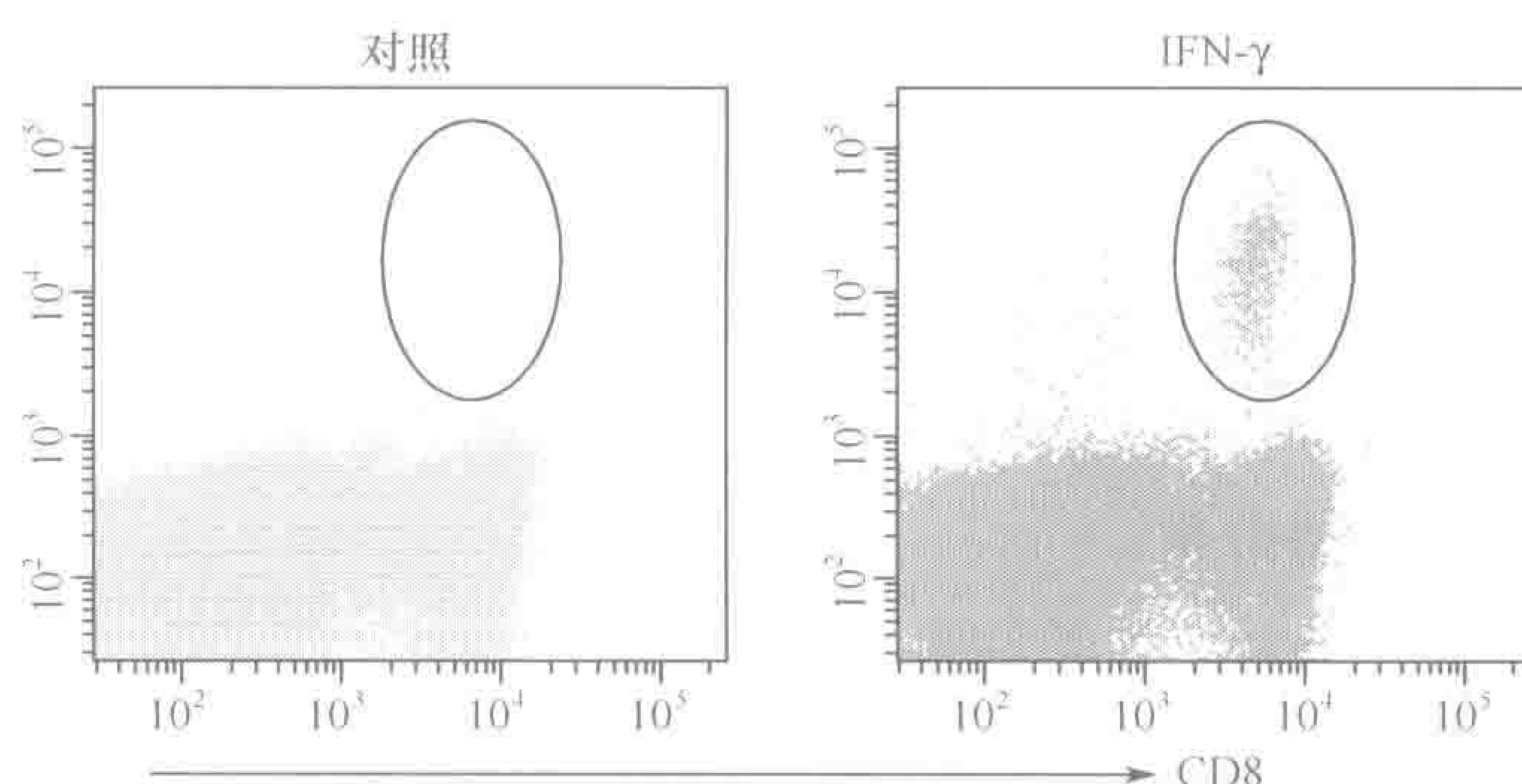


图4-5 IFN-γ胞内染色示意图

材料与试剂

C57BL/6J小鼠

$OVA_{257\text{-}264}$多肽

弗氏完全佐剂

高尔基体阻断剂BFA

细胞因子染色试剂盒（BD公司）：包括固定液与破膜液

细胞因子抗体anti-IFN-γ PE，表面抗体anti-CD8 FITC

流式细胞仪，CO_2培养箱，24孔细胞培养板

步骤

1. 细胞制备和激活（以OVA免疫后小鼠脾脏细胞为例）

1）以100μl 2mg/ml $OVA_{257\text{-}264}$和100μl弗氏完全佐剂混合悬液皮下免疫小鼠，4周后分离小鼠脾脏细胞，制备单细胞悬液。

2）用RPMI-1640完全培养液重悬细胞，用培养液调整细胞浓度为1×10^6～2×10^6

个/ml。加入抗原表位肽 $OVA_{257\text{-}264}$ 刺激，浓度为 1μmol/L。

3）混匀，37℃孵箱内培养 4～6h；最后 4h 加入细胞分泌阻断剂 BFA 致终浓度 10μg/ml。

4）收集细胞，调整细胞浓度为 1×10^7～2×10^7 个/ml。

2. 细胞表面染色

1）取 10μl 表面标记抗体 anti-CD8 FITC 加入 100μl 待测细胞，混匀，室温避光反应 20min。

2）加入 1ml PBS 洗液，3000r/min 离心 5min，弃上清。

3. 固定和破膜

1）200μl 4℃预冷的固定液重悬浮细胞，混匀，室温避光固定 20min。

2）加入 200μl 破膜液，3000r/min 离心 5min，弃上清。

3）再加入 200μl 破膜液重悬细胞洗一遍，弃上清。

4. 细胞内染色

1）30μl 破膜液重悬细胞，向每管加入 20μl 荧光标记胞内抗体 anti-IFN-γ PE，室温避光反应 30min。

2）每管加入 200μl 破膜液重悬细胞，1000r/min 离心 5min，弃上清。

3）加入 0.3ml PBS 洗液重悬细胞。

5. 流式细胞仪上样及结果分析

流式细胞仪上样及结果分析参见第二十五章。

注意事项

1）实验细胞可采用人 PBMC，刺激剂选择相应的各种病原体抗原表位，以监测是否有既往感染形成的记忆性 T 细胞。

2）细胞固定前一定不能加入破膜液，否则细胞形态会有严重改变。

3）细胞因子染色对照的选取应该是未刺激细胞标记相同的细胞因子，而不仅仅是使用同型抗体对照。

二、Tetramer 技术的原理与应用

T 细胞通过其表面 TCR 特异性识别抗原提呈细胞表面的 MHC-抗原肽复合物后，被活化和发生增殖，进而分化成效应细胞。而记忆性 T 细胞也是通过识别 MHC-抗原肽复合物被激活，因此，可以用 MHC-抗原肽复合物检测 T 细胞表面的特异性 TCR，来反映抗原特异性 T 细胞数量在记忆形成中的变化。在免疫反应高峰，形成大量的效应性 T 细胞，这些 T 细胞都是针对某些抗原表位的抗原特异性 T 细胞，而此后这些效应性抗原特异性的 T 细胞则经过一个收缩的过程，99%左右的细胞凋亡，被机体清除，而保留下来的这些抗原特异性 T 细胞在一段时间之后就可以被称为记忆性 T 细胞。这些抗原特异性的 T 细胞都可以用 MHC-Ⅰ类或者Ⅱ类分子四聚体（MHC class Ⅰ and class Ⅱ tetramers）标识。

TCR与MHC分子没有直接结合能力，但是当MHC分子荷载了一定长度的短肽之后，构型发生适应性改变，从而使得其能够与TCR发生结合。但是，由于MHC-抗原肽单体同TCR的亲和力较低，在很长的一段时间里，人们不能利用它们来进行各种抗原特异性T细胞检测。可溶性MHC-抗原肽四聚体的出现，极大地提高了复合物的稳定性和敏感性，克服了传统方法的局限性，可用于各种抗原特异性T细胞表型分析、分离和克隆化，也可用于检测抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞反应，为研究与细胞免疫反应有关的一系列工作提供了高效、快速、敏感的研究手段。

其基本原理是：将体外表达的MHC重、轻链分子及短肽共孵育，使其折叠成正确的构象，形成MHC-多肽复合体，再经过纯化，并借助于半胱氨酸的巯基与生物素结合，然后将一个标记荧光的链亲合素与4个生物素标记的MHC-肽复合体结合形成四聚体。这种MHC-多肽四聚体极大地提高了MHC-肽复合物同TCR的亲和力，与抗原特异性T细胞上的TCR结合后，即可通过灵敏度很高的流式细胞仪进行检测。

也有一些研究者尝试将MHC分子连接到免疫球蛋白或者Ig的Fc段以形成二聚体（dimer），也可以提高其亲和力，得以用于流式细胞检测抗原特异性T细胞。BD公司有商品化的dimer。另外，有方法将抗原多肽以非共价结合的方式与MHC-Ⅰ类或MHC-Ⅱ类分子四聚体相结合，用于流式检测分析或者细胞分离。这种方法体现了更大的灵活性，制备好的MHC分子四聚体可以根据需要装入相应的抗原肽，用于针对不同抗原表位T细胞的研究。

MHC分子四聚体又可分为MHC-Ⅰ类分子四聚体和MHC-Ⅱ类分子四聚体。如今，MHC-Ⅰ类分子四聚体技术已经发展较为成熟，应用也比较广泛；但是Ⅱ类分子四聚体的两条链都具有多态性，因此其构建相对来说要困难一些，应用不如Ⅰ类分子广泛。

此处以OVA免疫小鼠4周后分离得到的脾脏细胞为例，用MHC-Ⅰ类分子的四聚体检测OVA特异性的记忆性T细胞。实验结果如图4-6所示。

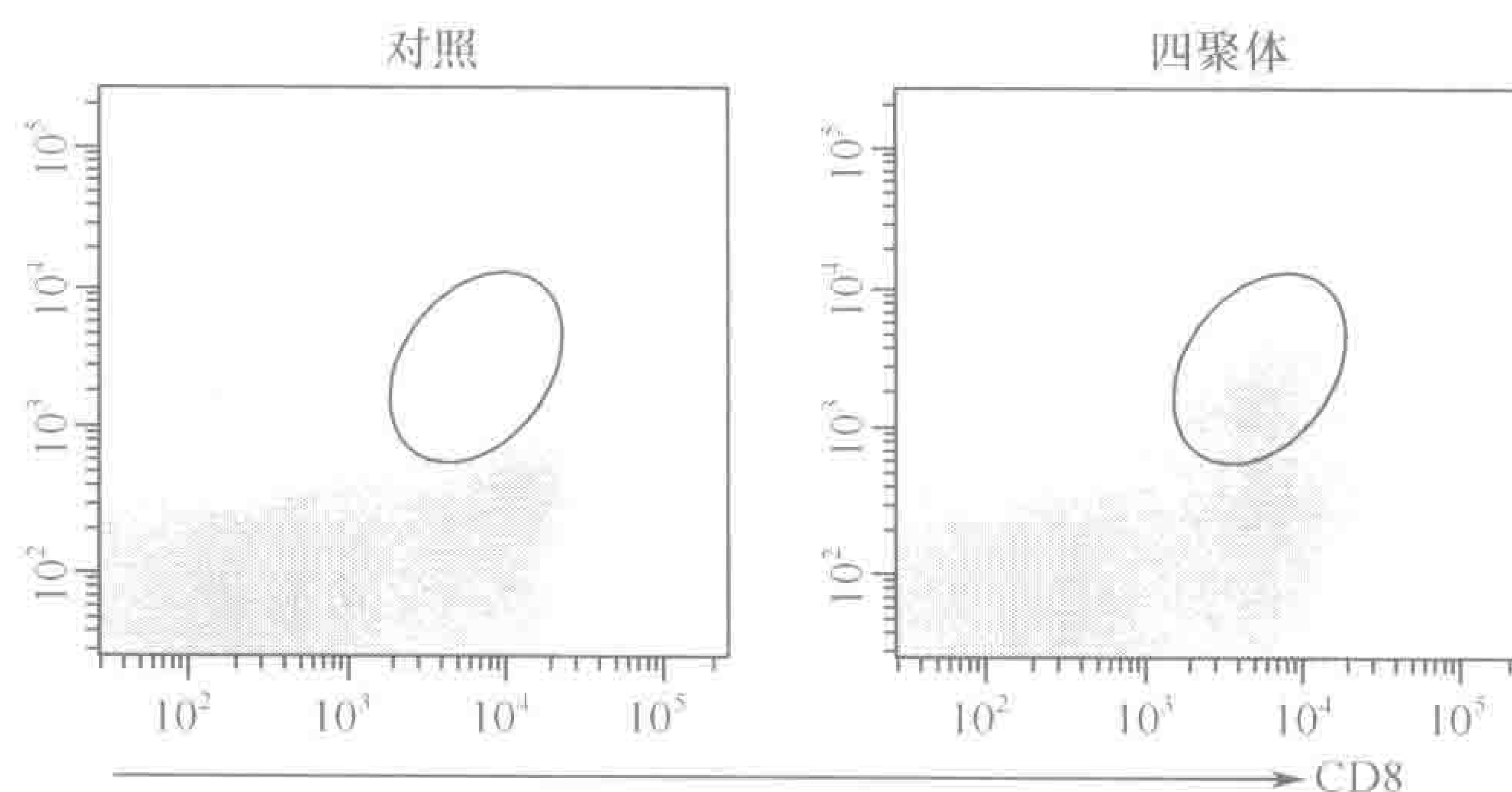


图4-6　H2-K^b/ova四聚体染色示意图

材料与试剂

C57BL/6J小鼠

$OVA_{257\text{-}264}$多肽

弗氏完全佐剂

anti-CD8 FITC

PE 标记的 MHC-Ⅰ四聚体 H2-K^b/$OVA_{257-264}$（K^b/OVA）：用含 1%FCS、pH7.4 的 PBS 配成 2mg/ml 溶液

洗涤液：含 2%BSA、pH7.4 的 PBS

固定液：1%多聚甲醛 PBS 溶液，pH7.4

流式细胞仪

步骤

1）以 100μl 2mg/ml $OVA_{257-264}$ 和 100μl 弗氏完全佐剂混合悬液皮下免疫小鼠，4 周后分离小鼠脾脏细胞，制备单细胞悬液。

2）用不同浓度梯度的四聚体染色同一细胞群体，确定 MHC 四聚体试剂的最佳滴度（通常为 1∶100～1∶200）。

3）配置 1×染色混合液，该混合液应该含有 anti-CD8 FITC 与适当稀释的四聚体 K^b/$OVA_{257-264}$（根据上一步结果选择稀释倍数）。

4）10^6 个细胞在室温下，300g 离心 5min，弃上清。

5）于各实验管中分别加入 50μl 1×染色混合液，混匀。

6）4℃孵育 60min，加入细胞洗液 200μl，1500r/min 离心 3min，反复洗涤 3 次。

7）加入固定液固定细胞。

8）上机检测。

注意事项

1）用来标记的细胞可以是抗原特异性的 T 细胞系、克隆、杂交瘤或 T 细胞受体转基因 T 细胞，或者来自对某一种感兴趣的抗原具有很强而且特征明显的应答个体的混合细胞群。

2）对于许多四聚体染色实验，由于特定细胞群体的数目可能相当低，因此必须从大量的细胞获取数据，以便获得更加可信的统计数据。

三、TCR 转基因小鼠

TCR 转基因小鼠常用来研究记忆性 T 细胞，这些小鼠的所有 $CD8^+$ 或者 $CD4^+$ T 细胞都表达某种特定已知抗原的 TCR，能够在接触到该抗原时迅速产生免疫反应，形成大量的效应性 T 细胞，再经过 2～3 周的收缩期，还能够形成一定数目的记忆性 T 细胞。表 4-2 罗列了一些常用的 TCR 转基因小鼠，包括 MHC-Ⅰ类分子限制性的和 MHC-Ⅱ类分子限制性的。

这些转基因小鼠在过继回输到受体小鼠体内后，用相应的抗原多肽或者表达抗原的病原体免疫后，能够依次经过一个扩增期、收缩期，之后形成记忆性 T 细胞。这样的记忆形成过程中，各个阶段抗原特异性 T 细胞的数目都要明显多于正常小鼠，所以监测起来要方便许多，因而在记忆的研究中被广泛应用。此处以 OVA 特异性的 OT-I $CD8^+$ T 细胞回输到正常小鼠，用 OVA 多肽免疫后，以 MHC-Ⅰ类分子四聚体监测记

忆性 T 细胞的形成。

表 4-2　常见 TCR 转基因小鼠及其 MHC 分子限制性

小鼠品系	MHC 限制性	TCR 基因	小鼠背景	相应抗原	最初出处
2C	Ⅰ	Va3/Vb8	H-2b	peptide SIYRYYGL	Sha et al., Nature, 1988, 336:73
OT-1	Ⅰ	Va2/Vb5	H-2b (K^b)	Chicken Ovalbumin 257-264	Hogquist et al., Cell, 1994, 76:17
P14	Ⅰ	Va2/Vb8.1	H-2b (D^b)	LCMV GP33	Pircher et al., Nature, 1989, 342:559
DO11.10	Ⅱ	Va2/Vb8.2	H-2d (I-A^d)	chicken ovalbumin 323-339	Murphy et al., Science, 1990, 250:1720
OT-Ⅱ	Ⅱ	Va2/Vb5	H-2b (I-A^b)	chicken ovalbumin 323-339	Barnden et al., Immunol Cell Biol, 1998, 76:34
Smarta	Ⅱ	Va2.3/Vb8.3	H-2b (I-A^b)	LCMV GP 61-80	Oxenius et al., Eur J Immunol, 1998, 28:390

材料与试剂

OVA 蛋白多肽
弗氏完全佐剂
CD8 阳选磁珠
MACS LS 分选柱及磁铁
H2-K^b/OVA 四聚体荧光抗体
OT-I TCR 转基因小鼠
C57BL/6J 受体小鼠

步骤

1）颈椎脱臼法处死 OT-I 小鼠，取脾脏，钢网仔细研磨，裂解红细胞，制备单细胞悬液。
2）离心沉淀重新悬浮于 0.9ml MACS 缓冲液中，加入 CD8 单抗磁珠 100μl，冰浴孵育 15min。用 MACS 缓冲液洗涤 2 次后（1500r/min 离心 5min），加入 1ml MACS 缓冲液重新悬浮。
3）将标记好抗体磁珠的细胞悬液通过 30μm 的滤网，将细胞悬液上样到 LS 分选柱上分选得到 $CD8^+$ T 细胞。
4）计数，调整细胞浓度为 10^5 个/ml。
5）尾静脉每只 C57BL/6J 受体小鼠注射 200μl $CD8^+$ T 细胞悬液。
6）24h 后，$OVA_{257\text{-}264}$ 多肽（200μg/只）和弗氏完全佐剂皮下免疫受体小鼠。
7）小鼠于 SPF 环境饲养，4 周以后 MHC-Ⅰ类四聚体检测阳性细胞，即为记忆性 T 细胞。

注意事项

1）对于 $CD8^+$ TCR 转基因细胞，目前认为回输的数量级应限制在 10^4 个以下，过继过多的 T 细胞将导致体内形成极大数量的效应性 OT-I $CD8^+$ T 细胞，不能真实反映机体的免疫反应状态。

2）对于 $CD4^+$ TCR 转基因细胞的回输，由于其增殖能力远远低于 $CD8^+$ T 细胞，故为了能够在体内追踪到，可以过继 10^6 个级别的细胞。

（许熊飞　徐　胜）

参考文献

Badovinac VP，Messingham K，Jabbari A，et al. 2005. Accelarated $CD8^+$ T cell memory and prime boost response after dendritic cell vaccination. Nat Med，11(7)：748～756.

Badovinac VP，Porter BB，Harty JT. 2004. CD8 T cell contraction is controlled by early inflammation. Nat Immunol，5：809～817.

Chen W，Jin W，Hardegen N，et al. 2003. Conversion of peripheral $CD4^+CD25^-$ naive T Cells to $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells by TGF-β induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med，198(12)：1875～1886.

Chung Y，Chang SH，Martinez GJ，et al. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. Immunity，30(4)：576～587.

Fantini MC，Dominitzki SD，Rizzo A，et al. 2007. *In vitro* generation of $CD4^+CD25^+$ regulatory cells from murine naive T cells. Nat Protoc，2(7)：1789～1794.

Fischer SF，Belz GT，Strasser A. 2008. BH3 only protein Puma contributes to death of antigen specific T cells during shutdown of an immune response to acute viral infection. Proc Natl Acad Sci USA，105：3035～3040

Gavin M A，Clarke S R，Negrou E，et al. 2002. Homeostasis and anergy of $CD4^+CD25^+$ suppressor T cells *in vivo*. Nat Immunol，3：33～41.

Harrington LE，Janowski KM，Oliver JR，et al. 2008. Memory CD4 T cells emerge from effector T cell progenitors. Nature，452：356～360.

Hataye U，Moon JJ，Khoruts A，et al. 2006. Naïve and memory CD4 T cell survival controlled by clonal abundance. Science，312：114～116.

Hou W，Kang HS，Kim BS. 2009. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. J Exp Med，206(2)：313～328.

Jenkins MR，La Gruta NL，Doherty PC，et al. 2009. Visualizing CTL activity for different $CD8^+$ effector T cells supports the idea that lower TCR/epitope avidity may be advantageous for target cell killing. Cell Death Differ，16(4)：537～542.

Kim GG，Donnenberg VS，Donnenberg AD，et al. 2007. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells：comparisons to a 4 h ^{51}Cr-release assay. J Immunol Methods，325(1～2)：51～66.

Lang KS，Recher M，Junt T，et al. 2005. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. Nat Med，11(2)：138～145.

Lee YK，Turner H，Maynard CL，et al. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. Immunity，30(1)：92～107.

Mempel TR，Pittet MJ，Khazaie K，et al. 2006. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. Immunity，25(1)：129～141.

Prlic M，Bevan MJ. 2008. Exploring regulatory mechanisms of CD8 T cell contraction. Proc Natl Acad Sci USA，105(43)：16689～16694.

Qian C，An H，Yu Y，et al. 2007. TLR agonists induce regulatory dendritic cells to recruit Th1 cells via preferential IP-10 secretion and inhibit Th1 proliferation. Blood，109(8)：3308～3315.

Reijonen H，Kwok WW. 2003. Use of HLA class II tetramers in tracking antigen-specific T cells and mapping T-cell epitopes. Methods，29(3)：282～288.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol, 155: 1151～1164.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell, 133(5): 775～787.

Schulz O, Diebold SS, Chen M, et al. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. Nature, 433(7028): 887～892.

Sheehy ME, McDermott AB, Furlan SN, et al. 2001. A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis. J Immunol Methods, 249(1～2): 99～110.

Shevach E, Thornton AM. 2005. Proliferative assays for T cell function. Curr Protoc Immunol, Chapter 3: Unit 3.12.

Sun JC, Bevan MJ. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. Science, 300(5617): 339～342.

Tang H, Zhang M, Guo Z, et al. 2006. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL-10. Blood, 108: 1189～1197.

Tiffany H, Jelena SB, Ruslan M. 2007. NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. Nat Immunol, 8: 1345～1352.

Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. 2003. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. J Clin Invest, 111(7): 1065～1072.

Verhoef A. 2008. Production of human T-cell clones methods. Mol Med, 138: 43～50.

Williams MA, Ravkov EV, Bevan MJ. 2008. Rapid culling of the CD4 T cell repertoire in the transition from effector to memory. Immunity, 28: 1～13.

Yssel H, Spits H. 2005. Long-term and immortalized human cell lines and clones. Curr Protoc Immunol, Chapter 7: Unit 7.19.

Zhang M, Tang H, Guo Z, et al. 2004. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. Nat Immunol, 5(11): 1124～1133.

Zhou L, Ivanov II, Spolski R, et al. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol, 8(9): 967～974.

第五章　B 淋巴细胞

第一节　概　　述

B 淋巴细胞（B lymphocyte），来源于骨髓的多能干细胞。在禽类是在法氏囊内发育生成，故又称囊依赖淋巴细胞（bursa dependent lymphocyte）/骨髓依赖性淋巴细胞，简称 B 细胞（Batista and Harwood，2009）。哺乳类动物在胚胎早期，B 细胞分化部位是在胚肝，晚期至出生后则在骨髓内分化成熟，故又称骨髓依赖淋巴细胞。祖 B 细胞由骨髓中的淋巴干细胞分化而来，在迁入法氏囊或类囊器官，即中枢免疫器官后，经历前 B 细胞、未成熟 B 细胞等阶段，逐步分化为有免疫潜能的成熟 B 细胞。成熟的 B 细胞经外周血迁出，进入脾脏、淋巴结，主要分布于脾小结、脾索及淋巴小结、淋巴索及消化道黏膜下的淋巴小结中，受抗原刺激后，在 T 细胞的辅助下，大部分 B 细胞最终分化增殖为可合成和分泌抗体的浆细胞，并在血液中循环主要执行体液免疫的功能，也具有抗原提呈的功能。少数 B 细胞分化为长寿记忆性 B 细胞，再次遇到该抗原时即可迅速增殖，产生强烈的再次免疫应答（Moir and Fauci，2009）。

第二节　B 淋巴细胞的分离和亚群鉴定

一、B 淋巴细胞的分离

B 淋巴细胞的分离技术是免疫学的一项十分有用的基本技术，目前可采用多种方法分离和富集 B 淋巴细胞。本节将主要介绍尼龙棉柱法、单克隆抗体法、磁珠法和流式荧光法。

材料与试剂

尼龙棉
抗小鼠 T 细胞单克隆抗体
兔补体
Percoll 原液
PBS 液
CD19（B220）（CD45R）磁珠
Midi MACS 分离磁铁
MACS 多用支架
LS 分选柱（Miltenyi）

连接有荧光素的抗 CD19（B220）（CD45R）的抗体
特异的抗 CD19（B220）（CD45R）第一抗体
荧光标记的第二抗体、生物素/链亲和素或者多色标记的抗体
MACS 缓冲液
RPMI-1640 完全培养基
30μm 尼龙网（BD）或 40μm 预分离滤膜（Miltenyi）
25G 针头的 1ml 注射器
60mm×15mm 的培养皿
剪刀
6ml 注射器的活塞
烧杯，铝箔，漏斗，一次性手套
装填尼龙棉柱，一次性注射器
15ml 离心管
高速离心机
流式细胞分选仪

（一）尼龙棉柱分离 B 细胞法

B 淋巴细胞具有黏附到尼龙棉上的特性。混合单个核细胞悬液在通过尼龙棉柱时，B 细胞、浆细胞、单核细胞和一些辅助细胞被选择性黏附于尼龙棉上，而多数 T 细胞则通过尼龙棉柱，使用 B 细胞的这一特性，可以将 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞分离开来。尼龙棉柱分离法细胞回收率高，能同时获得 T、B 细胞两个群体，但是细胞纯化效果较单克隆抗体法差，B 细胞纯度平均只能达到 85.5%。

步骤

1）使用颈椎脱臼法和 CO_2 吸入法处死小鼠。
2）制备分离 B 细胞所需的细胞悬液。①如果是从骨髓制备，首先取小鼠的股骨和胫骨，去除骨头上的肌肉，用装有 25G 针头的 1ml 注射器吸取 RPMI-1640 完全培养基冲洗骨髓腔以获取骨髓。②如果是从脾脏制备，首先将新鲜分离的脾脏放入盛有 3ml RPMI-1640 完全培养基的 60mm×15mm 的培养皿中，用剪刀将脾脏剪碎，用 6ml 注射器的活塞将组织块轻轻碾磨。低渗法去除红细胞，调节细胞数至 1×10^7 个/0.5ml。③若分离人的外周血 B 细胞：取自然沉降的上层血浆，过聚蔗糖-泛影葡胺分层液后，获取血浆和分层液之间的单个核细胞层。将要分离的细胞液用预先加温的培养液稀释成适当的浓度，约 5×10^7 个/ml。
3）将细胞悬液通过 200μm 尼龙滤网滤入离心管中。用约 4ml 培养基冲洗一次培养皿，然后将洗液通过滤网加入离心管中。
4）尼龙棉的清洗与干燥。①戴上已经洗去滑石粉的一次性手套，将尼龙棉（1 或 2 包，每包 35g）放入烧杯中，加入蒸馏水或去离子水，用铝箔盖上烧杯并煮沸约 10min。②冷却至常温，倒入漏斗内，使水滴干。③重复步骤

1）和步骤 2）6 次。④将尼龙棉摊在铺有纱布的方盘内，37℃温箱干燥2～3d 后，贮藏在带盖的方盘内。

5）装尼龙棉柱。①取 50ml 玻璃注射器，拔去注射芯，在注射器头上套一段带夹子的胶管。②将尼龙棉梳理，并适当折叠，以适应注射器的直径，填入注射器内，约 20ml 的体积。③将填好尼龙棉的注射器连同注射器芯一起包好，高压灭菌。④将注射器固定在支架上，倒入 37℃的细胞培养液，关闭阀门一定时间，然后打开阀门，放掉细胞培养液，从而清洗尼龙棉数次，关上阀门。

6）取 0.5ml 细胞悬液，垂直滴加于制备好的尼龙棉柱中（柱长 12cm，内径 5mm，下端呈 30°～40°锐角）。

7）使液面高于尼龙棉柱。盖上注射器，水平横卧放置尼龙棉柱，37℃温育 45min～1h。

8）用 37℃预温的 5%FCS-PBS 液洗脱，收集洗脱液中的 T 淋巴细胞。再用 5%FCS-PBS 液边洗脱边挤压尼龙棉柱，收集洗脱液中的 B 淋巴细胞。

注意事项

1）吸附 B 细胞的多少与尼龙棉的质量有关，与装柱的松紧也有关系。

2）用过的尼龙棉可回收，以盐水洗涤，然后浸入 0.1mol/L 的 HCl 中过夜，再同前法清洗。

3）所有使用的缓冲液均需冰浴，并且所有的操作均需在冰上完成。

（二）单克隆抗体分离 B 细胞法

单克隆抗体分离 B 细胞法的原理是将 T 细胞特异性单克隆抗体结合 T 细胞，通过补体介导的细胞毒作用，引起 T 细胞的裂解，进一步通过 Percoll 密度梯度离心法去除死细胞，即可收集第二层中的 B 细胞，从而实现 B 细胞的初步纯化。

单克隆抗体分离法虽然分离步骤多，B 细胞回收率较低，但是所分离得到的 B 细胞纯度较高（>95%），最大限度地去除了 T 细胞对实验的干扰，并且所获得的细胞活力高。

步骤

1. 抗小鼠 T 细胞单克隆抗体通过补体裂解 T 细胞

在制备好的脾脏淋巴细胞悬液内，加入抗小鼠 T 细胞单克隆抗体，以 10∶1（体积比）的比例混合细胞悬液和抗体混合液。每管 0.5ml，37℃下温育 30min，再加兔补体（4∶1）0.5ml/管 37℃继续温育 30min，通过补体介导的细胞毒作用，引起 T 细胞 100%裂解，PBS 洗涤一次，备用。

2. Percoll 法分离 B 细胞

取 Percoll 原液 5ml 加 0.2mol/L PBS 4.5ml 混匀，经高速离心机 10 000*g* 离心 45min，使其形成连续密度梯度。将上述经单克隆抗体和补体处理后的淋巴细胞悬液，轻轻平铺于 Percoll 层表面，2000*g* 水平离心 20min，丢弃第一个白环层死亡的 T 细胞，小心地收集第二个白环层活的 B 细胞，用 PBS 洗涤一次，计数。备用。

（三）用磁性分选柱手工操作分离总B细胞

免疫磁珠分选法是一种带有磁性高分子聚合微球体，其表面覆盖有特异性单克隆抗体或第二抗体，可分别与具有特异性抗原的靶细胞或包被了具特异性抗体的靶细胞相结合，再用永久性磁铁吸引住靶细胞，是一种简单、快捷、分选纯度高的细胞分选法。本实验以德国的MACS免疫磁珠细胞分离磁铁，采用直接阳性分选法分离CD19（B220）$(CD45R)^+$细胞为B细胞，还可用AUTOMACS系统直接阳性分选法自动分离CD19（B220）$(CD45R)^+$B细胞，实验原理和手动操作相似。当大量制备所需B细胞时，可应用自动分选的方法，能够在较短的时间内分选出大量纯度较高的B细胞，从而保持细胞活性，但所需磁珠量应准备充足。因为磁珠是纳米级的，一般不会对细胞后续培养造成影响。但是如果实验需要解离与磁珠结合的细胞，避免干扰，则可使用自然降解法和Detach-a-bead多克隆抗体解离B细胞，其中Detach-a-bead是一种能够与小鼠单克隆抗体的Fab片段结合的多克隆抗体，因而可打断细胞与磁珠的连接。

步骤

1）制备分选B细胞所需的细胞悬液。

（1）分离人外周血B细胞：①抗凝血的处理：用3倍体积的含1%FBS的PBS稀释5～50ml血于容量为250ml的细胞培养瓶中，冰浴。②已分离PBMC的处理：用冷的含1%FBS的PBS重悬细胞于15ml聚丙烯试管中，浓度为1×10^7～2×10^7个/ml，冰浴。③振荡磁珠包被的抗CD19，加入至15ml聚丙烯试管中。每个靶细胞加4～10个磁珠，估计全血含B细胞为5×10^5个/ml。

（2）分离小鼠B细胞：取2只小鼠的脾脏制备单细胞悬液，去除红细胞，将细胞在10ml HBSS洗涤缓冲液中混悬后用血细胞计数器计数。将细胞悬液在4℃，200g离心10min，弃上清后将沉淀按10^8个细胞0.9ml MACS缓冲液的比例混悬。每10^8个细胞加入0.1ml CD19磁珠后在4℃孵育15min。

2）将细胞悬液在4℃，200g离心10min。

3）离心期间，将Midi MACS分离磁铁安装到MACS多用支架上，并将LS分选柱放到磁体中，在分选柱下放一支无菌的15ml离心管。用4℃不含气体的MACS分选缓冲液冲洗分选柱3次，每次3ml。弃洗脱液，在分选柱下方放置一支干净的无菌离心管。

4）离心结束后弃上清，将沉淀按10^8个细胞/ml的浓度用MACS缓冲液彻底混悬。将细胞通过30μm尼龙网或40μm预分离滤膜。用0.1×0.4ml MACS缓冲液冲洗滤网。

5）将细胞悬液上样到LS分选柱上。

6）用MACS缓冲液冲洗分选柱3次，每次3ml。第一个3ml应缓慢加入以免扰动分选柱中的细胞。

7）从磁体上取下分选柱，放在一个干净的无菌15ml离心管上。在分离柱中加入5ml MACS缓冲液，将活塞塞进分离柱并洗脱阳性细胞。

8）将B细胞悬液在4℃，200g离心10min。弃上清后将沉淀用2×5ml RPMI-1640完全培养基混悬。计数。

9）解离与磁珠结合的B细胞。

（1）用自然降解法解离与磁珠结合的B细胞：①用10ml冷的RPMI-1640完全培养基重悬结合磁珠的B细胞，转移入25cm^{2}细胞培养瓶，在37℃，5% CO_2培养箱中孵育过夜。②重悬B细胞于15ml管中，室温下磁性分离免疫磁珠（现在已从B细胞上脱离）。吸取未结合的B细胞悬液至新的15ml管中。如果需要，重复分离去除多余的磁珠。③4℃，150g离心B细胞10min，弃上清，以适当浓度重悬B细胞于冰冷的RPMI-1640完全培养基中（或其他适当培养基）。用流式细胞仪检测纯度。

（2）用Detach-a-bead多克隆抗体解离B细胞：①用100μl冷RPMI-1640完全培养基重悬结合磁珠的B细胞，转移入15ml离心管中，加入10μl（1U）Detach-a-bead，摇床上室温孵育45～60min。②用7ml冷的RPMI-1640完全培养基重悬B细胞，将试管放入磁场分离免疫磁珠。注射器尖端置于瓶底或管底收集未结合B细胞悬液至新的50ml置于冰浴的离心管中。重复2或3次，将B细胞悬液倒入同一离心管中。③4℃下150g离心B细胞10min，弃上清，重悬B细胞于冰的RPMI-1640完全培养基中（或者其他适当培养基），再次离心。重复洗1或2次或者多次，以适当浓度重悬B细胞于冰的RPMI-1640完全培养基中，流式细胞仪检测纯度。

注意事项

当制备少量B细胞时，推荐使用手动分选法，能够节省相关磁珠用量，并提高纯度。

（四）流式荧光分离B细胞法

流式细胞仪又称为荧光激活细胞分选仪（fluorescence-activated cell sorter，FACS），是一种在功能水平上对单细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选的检测手段，可以每秒钟分析上万个细胞，并能同时从一个细胞中测得多个参数，其应用范围非常广泛，其中细胞分选是它的重要应用之一。它能够根据B细胞的光散射和荧光特征，将特定的B细胞从细胞群体中分选出来。

本实验可通过直接免疫荧光标记法和间接免疫荧光标记法标记B细胞（Matteucci and Giampietro，2008）。其中，直接法操作简便，结果准确，易于分析，适用于同一细胞群多参数同时测定。虽然直标抗体试剂成本较高，但减少了间接标记法中较强的非特异荧光的干扰，因此更适用于临床标本的检测。而间接法费用较低，二抗应用广泛，多用于科研标本的检测。但由于二抗一般为多克隆抗体，特异性较差，非特异性荧光背景较强，易影响实验结果。所以标本制备时应加入阴性或阳性对照。另外，由于间标法步骤较多，增加了细胞的丢失，不适于测定细胞数较少的标本。

步骤

1）按前述方法制备并标记分选B细胞所需的单细胞悬液。4℃下300g离心20min，

弃上清。重悬细胞沉淀于10ml的4℃缓冲液中。台盼蓝拒染法确定活细胞数。

2）4℃，300g离心10min，弃上清。重悬细胞于缓冲液中。调整细胞终浓度为2×10^{7}个/ml。取出50μl的细胞（1×10^{6}个），置于12mm×75mm的圆底试管，或者96孔圆底培养板。

3）免疫荧光抗体标记B细胞。①直接免疫荧光标记B细胞法：在上述细胞中直接加入10μl连接有荧光的抗CD19（B220）（CD45R）的抗体进行免疫标记反应（如做双标或多标染色，可把几种标记有不同荧光素的抗体同时加入），混匀，冰浴20min。②间接免疫荧光标记B细胞法：先加入特异的抗CD19（B220）（CD45R）第一抗体，待反应完全后洗去未结合抗体，再加入荧光标记的第二抗体、生物素/链亲和素或者多色标记的抗体。若使用试管进行标记：用2ml缓冲液洗涤2次，每次4℃，300g离心6min，弃上清。若用培养板进行标记，每次用100μl缓冲液洗涤，共3～5次。每次4℃，500g离心5min，弃上清。

4）用4℃的荧光标记用的缓冲液400μl重悬待分选的细胞。上机前一直放置于4℃。

5）参照第二十五章相关内容的具体操作步骤，调试流式分选仪。选定所需细胞群，进行流式分选。

注意事项

1）流式细胞仪分离细胞的量有一定的限制，一次分离的最大合理量约为10^{8}个细胞。如果细胞量超过10^{9}个，则需要耗费10h以上，分选后细胞的活力会受到很大的影响。所以需分选单细胞悬液里B细胞的含量，准备适当数量的细胞悬液。

2）可以同时给液滴充以不同的电量，调整液滴的偏转角度，实现多个表面标记细胞群的分选，从而实现B细胞和其他细胞群的同步分离。

3）如果能保证流式细胞仪的无菌状态，那么分选后的B细胞还可以进行培养或其他分析。

二、各类B细胞亚群的鉴定和分离

随着荧光激活细胞分选仪技术飞速发展，目前可通过确定选择性表达的表面蛋白和其他标志，鉴定和分选不同的B细胞亚群。在过去的30年中，FACS从只能检测两种荧光的单激光管发展到含有3个激光管检测12色荧光，并能检测细胞的大小和颗粒度。B细胞亚群的鉴定与FACS的发展密切相关。分泌抗体的B细胞是第一个通过单激光FACS被鉴定和分选的细胞（1969年），到1982年，通过双激光FACS，脾脏和淋巴结中最基本的B细胞亚群被首次鉴定。随后，一系列B细胞的不同发育阶段细胞亚群包括祖B细胞、前B细胞、未成熟B细胞和循环B细胞群被逐渐发现。同时，多种功能不同的外周B细胞亚群包括B-1a、B-1b、B2和边缘区（marginal zone，MZ）B细胞也进入了人们的视野（Weill and Weller，2009）。

根据表型、解剖学定位和功能特点的不同，B细胞可以分为B1细胞和B2细胞。B2细胞即通常所指的B细胞。B1细胞主要存在于胸膜腔、腹膜腔和黏膜组织，B2细

胞主要存在于次级淋巴组织。腹膜的 B1 细胞表达 Mac-1（CD11b），脾脏中的 B1 细胞不表达 CD11b。根据 CD5 的表达与否，B1 细胞可进一步分为 B-1a 细胞（$CD11b^+CD5^+$）和 B-1b 细胞（$CD11b^+CD5^-$）。B-1a 细胞及其分泌的天然抗体为幼儿免受细菌感染提供了天然的保护。B-1b 细胞具有独特的功能，在感染时它能针对多糖和其他非 T 细胞依赖性的抗原产生长期的抗体应答。

骨髓中未成熟的 B 细胞表面表达 IgD、CD21 和 CD22，低表达 B220 分子。未成熟的 B 细胞无需 MHC-Ⅱ类分子限制性 T 细胞的辅助，就能针对非 T 细胞依赖性的抗原，如脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）产生快速的免疫应答。未成熟 B 细胞进一步发育为过渡细胞 T1 B 细胞（$CD24^{high}CD21^-B220^+$）和 T2 B 细胞（$CD24^{high}CD21^+B220^+$）。T2 B 细胞在脾脏和淋巴结的滤泡中分化为成熟的滤泡 B 细胞（follicular B cell，Fo B），表型为 $CD24^+CD21^+B220^+$。T2 B 细胞在脾脏中分化为边缘区 B 细胞（marginal zone B cell，MZB），表型为 $CD1d^{high}CD21^{high}$。T2-MZ B 细胞的前体具有 $CD1d^{high}CD23^+$ 的表型（Bleesing，2004；Allman and Pillai，2008）。

MZB 细胞是小鼠脾脏 B 细胞中独特的一群，能对炎症刺激和抗原产生快速应答，分化为浆细胞，在 1～2d 内产生抗体。主要参与早期对病原体的固有免疫应答，是机体抵抗血源性抗原的第一道防线。人类和啮齿类动物的脾脏边缘区微解剖学特征有差别，人类是否存在 MZB 细胞目前还不十分清楚。

当这些不同的 B 细胞亚群存在于同一器官时，如何通过 11 色多通道荧光激活细胞分选仪（Hi-D FACS）分析细胞表型，将彼此分离鉴定，本文将就此做详细介绍。

材料与试剂

Fc 阻断剂（CD16/CD32）

分选各类 B 细胞亚群所需的流式抗体

Hi-D FACS 流式细胞仪

步骤

1）制备小鼠脾脏、腹腔或骨髓来源的细胞悬液。将 0.5×10^6～1×10^6 个细胞重悬于 50μl 的标记液中，在标记前加入 Fc 阻断剂（CD16/CD32），以防止 Fc 受体结合抗体。

2）准备标记组合：使用每种试剂的推荐滴度，并加入足够数量的荧光素标记的抗体到 50μl 的标记液中，11 色 B 细胞标记组合见表 5-1。

表 5-1　鉴定 B 细胞亚群的 11 色荧光抗体标记组合

特征性标记	荧光染料	二抗	特征性标记	荧光染料	二抗
CD21	FITC		CD43	APC	
B220	PE		CD23	Cy5.5APC	
CD5	Cy5PE		IgM	Cy7APC	
CD24	biotin	SA-Cy5.5PerCP	CD3ε，CD8α，Gr-1	CaBlu	
IgD	Cy7PE		Mac-1	CasYel	
BP-1	Alexa594				

3）将细胞加入标记液中，冰浴 15min。

4）加入 200μl 的标记液，800*g* 离心 5min，弃上清。重复洗 2 次。用 200μl 的标记液重悬细胞，加入 PI，终浓度为 1μg/ml。将其转移入流式管，上机。

5）如果一抗是生物素标记的抗体，需将适合浓度的链亲和素（streptavidin，SA）荧光染料加入细胞内（已标记含生物素的抗体），冰浴 15min。加入 200μl 的标记液，800*g* 离心 5min，弃上清，从而洗去未结合的二抗。用 200μl 的标记液重悬细胞，加入 PI，终浓度为 1μg/ml。将其转移入流式管，上机。

6）使用流式细胞仪收集分析 11 色荧光的实验数据，根据流式分析 B 细胞亚群的鉴定调节，在分选流式细胞仪上圈定所要分选的具有独特表面标记的 B 细胞亚群，进行流式荧光分选，方法同前。

注意事项

1）本实验还需根据 B 细胞的荧光素标记抗体的不同组合设立荧光补偿对照组，对照组可以是细胞或抗体俘获（抗大鼠 Ig 或抗小鼠 Ig）的微球。

2）本实验还需根据 B 细胞的荧光素标记抗体的不同组合设立某一荧光缺失实验组（fluorescence-minus-one，FMO），即在整个荧光标记组合中，有一种荧光标记缺失。此实验组的设定，有助于确定缺失荧光染料的有效 B 细胞背景信号的分布。

三、抗原特异性记忆性 B 细胞的鉴定

成熟 B 细胞被抗原活化后首先促使生发中心的形成，产生浆母细胞和短寿命浆细胞。初次免疫应答的第二周即可产生生发中心衍生的记忆性 B 细胞。此时的记忆性 B 细胞由于体细胞的高频突变，表达具有较高亲和力的突变 BCR。抗原激发后记忆性 B 细胞持续存在，在第二次抗原应答时迅速扩增，终末分化为分泌抗体的浆细胞。与胎肝和成人骨髓中 B 细胞发育的早期阶段相类似，浆细胞的发育也被一系列的转录因子紧密调控，其中最值得关注的是 Bcl-6 和 BLIMP-1。持续存在的抗原特异性的抗体来自长寿命的浆细胞。初次和再次免疫应答在脾脏中形成各自独立的长命浆细胞库，它们可进入骨髓，在骨髓中形成生存龛（survival niche），在整个动物的生命过程中一直存在，而不需要自我补给或循环。骨髓中浆细胞库的维持并不需要从记忆性 B 细胞库中不断补充。但是，当骨髓浆细胞库耗尽以后，会从记忆性 B 细胞库中重新补足。因此，持续存在的抗原、细胞因子或 TLR（Toll-like receptor）受体信号可以使记忆性 B 细胞库长期分化为长寿命浆细胞，不断产生长寿命的抗体（Heyzer-Williams，2003）。

静息的抗原特异性记忆 B 细胞至少存在两种表型特异的细胞群，其主要区别在于 B220 的不同糖基化，即穿膜磷酸酶 CD45R 的 B 细胞糖基化形式，能够通过是否结合单克隆抗体 RA36B2 进行鉴定。$B220^+$ 记忆细胞群表现为更强的增殖能力，而 $B220^-$ 记忆细胞群表现为更强的分化为浆细胞和分泌抗体的能力。

记忆性 B 细胞亚群的鉴定并没有一定的标准，在此主要介绍抗原特异性记忆性 B 细胞亚群的一些特异性的表面标志。表 5-2 总结了初次免疫 7～14d 时的表型。

表 5-2　抗原特异性记忆性 B 细胞亚群的特异性标志

细胞表型	T 细胞	IgD^+ $B220^+$ naive	NP-特异性 B 细胞		
			$B220^+$	$B220^-$	$CD138^+$
B220	—	+++	++++	—	+
CD138	—	—	—	—	+++++
CD79b	—	++	++	++	+
CD11b	—	—	—	+++	+
CD19	—	+	++	—	+
CD21	—	+	+	+	—
CD22	—	++	++	++	+
CD24	—	+	+++	—	+
CD43	+	—	—	+++	+++
CD45R	+	+	++	+	+
PNA	+	+	++	++	+
GL7	—	—	++（&—）	—	—
BLA-1	—	++	++	+	+

注：—，0～20；+，21～100；++，101～300；+++，301～600；++++，601～900。数值代表平均荧光强度（mean fluorescence intensity，MFI）

在本文中，主要介绍针对 TD 抗原 NP-KLH 的记忆反应。这种半抗原-蛋白质连接物，若使用 monophosphoryl lipid A 作为佐剂能够诱导大量分泌 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 的半抗原特异性 B 细胞。腹腔内免疫能够在初次免疫 7d 后诱导抗原特异性克隆在脾脏内扩增，而生发中心的反应能够持续 3 周左右，从而产生能够维持动物一生的记忆性 B 细胞。当抗原再刺激时，原来静息的记忆性 B 细胞能够大量扩增并促进浆细胞的发育（Tarlinton and Radbruch，2008）。

本小节主要使用 6 色流式细胞仪分析鉴定和分离抗原特异性 B 细胞，通过对目标细胞群的表型分析，分离出静息记忆性 B 细胞群，并将单独的记忆性 B 细胞亚群回输入受体鼠检测记忆活性，还可通过单细胞受体库分析，确定感兴趣的记忆性 B 细胞亚群的体细胞高频突变的存在。

材料与试剂

NP-KLH

Ribi 佐剂（RibiImmunochem Research；Hamilton，MT）

0.14mol/L NH_4Cl

含有 5%的胎牛血清的 PBS

荧光标记 mAb（购自 Pharmingen）

FACS-Vantage SE 流式细胞仪

72 孔微量滴定架（Robbins Scientific，Sunnyvale，CA）

CL-6B 琼脂糖（Pharmacia，Piscataway，NJ）

9600 GeneAmp PCR 仪（PerkinElmer）

步骤

1. 免疫小鼠

1）使用400μg NP-KLH溶于Ribi佐剂，腹腔免疫6～10周的C57BL/6J小鼠。

2）初次注射至少6周后，再次用同样的方法免疫该小鼠。

3）可在第1周时处死小鼠，用以检测免疫记忆急性期阶段的反应，也可以在6周后处死小鼠以获得大量的静息记忆性B细胞。

2. 制备分选B细胞所需的脾脏单细胞悬液

取脾脏，钢网碾磨，裂解红细胞，重悬细胞密度为4×10^8个/ml。

3. 荧光抗体标记记忆性B细胞

本方案适用于FACS-Vantage SE流式细胞仪，带有488nm和647nm两种激发光，能够进行6色荧光8参数检测分析。

1）将需要标记的脾细胞重悬，细胞密度为2×10^8个/ml，冰浴45min，标记合适浓度的荧光标记mAb。主要使用以下抗体标记细胞：Cy5PE-anti-CD4、Cy5PE-anti-CD8、FITC-anti-IgD、PE-anti-CD138/syndecan、Cy7PE-anti-CD-45R/B220、APC-NP（4-羟基-3-硝基苯胺）和biotin-anti-CD79b。

2）标记后用含5% FCS的PBS洗2遍，重悬细胞于含合适浓度的streptavidin（抗生物素蛋白链霉素）-Cy7APC的标记液中，标记15min。

3）PBS洗2遍，重悬于含有2μg/ml PI（用于排除死细胞）的含5%FCS的PBS中，冰浴用于流式分选。

4. 运用表型流式分析确定静息记忆性B细胞群

区分抗原特异性记忆性B细胞的关键是使用通道排除法，即首先用CD4和CD8-Cy5PE排除了T细胞以及非特异性结合抗体和蛋白质的细胞。下一步将表达syndecan的细胞群确定为浆细胞，将表达CD79b的细胞群确定为B细胞。随后，找寻那群缺失了sIgD（和IgM）和能够结合NP的细胞（分别代表初次免疫42d后的和再次刺激5d后的静息记忆性B细胞群）。最后，分析3种主要的NP^+记忆性B细胞亚群（$PI^-CD4^-CD8^-CD79b^+IgD^-NP^+$）的B220和syndecan（CD138）的表达谱。其中一群为NP特异性$CD138^+B220^{int}$浆细胞（对于此亚群的鉴定方法为：分选后进行ELISPOT实验，约>60%的细胞能够自发地分泌NP特异性的IgG）。有研究发现，NP特异性$CD138^-$B细胞也可分为表达不同水平B220的两群。在记忆反应中，极少量的$B220^+$记忆性B细胞表达GL7，有可能代表扩增的记忆性B细胞。在第5天的最大群的记忆性B细胞群是$B220^-$NP特异性并具有记忆性浆细胞前体的表型。

5. 流式分选静息记忆性B细胞亚群细胞

本步骤主要集中于纯化两类非分泌性记忆性B细胞（用抗原特异性ELISPOT直接检测）。这两类细胞具有NP-特异性（$CD4^-CD8^-F4/80^-IgD^-NP^+$）和$CD138^-B220^+$或$CD138^-B220^-$的特性。这样初步的分选能够从脾细胞悬液中分离

出所有的 NP 特异性 B 细胞和浆细胞。然后再从 NP 特异性细胞亚群中分选出静息记忆性 B 细胞。分选过程均需在 4℃的条件下进行。当所需细胞亚群被分选出后，取少量样品细胞用 PI 稀释，上样检测分选的纯度。在制备好注射用细胞混合液后，在静脉过继回输之前马上检测样品的纯度，要求其纯度必须达到 95%～99%，如果有超过 5%的杂细胞就不能进行下一步的实验。

6. 过继回输静息记忆性 B 细胞亚群

将分选到的静息记忆性 B 细胞亚群混匀，静脉回输至 Rag I 缺陷的动物体内。背景细胞量为 5×10^6～8×10^6 才能支持体内的记忆性 B 细胞反应。4×10^4～6×10^4的 NP 特异性记忆性 B 细胞能够在 5d 后引起受者体内再次反应。在再次反应后的第 4 天和第 42 天，根据合适的表型分选出记忆性 B 细胞。细胞混悬液被离心并重悬于 100μl PBS 中用以尾静脉注射。

7. 免疫被过继回输的受体小鼠

在静脉注射约 15min 时，每只小鼠用 50μg 无佐剂的 NP-KLH 腹腔注射进行冲击，在受体小鼠内启动免疫反应。

8. 记忆性 B 细胞亚群过继回输后的再分析

5d 后，处死小鼠，取脾脏，再次分析 NP-特异性反应。其步骤与前面第一次分离一致，重点放在体内细胞扩增的总的细胞数。收集血清检测抗原特异性抗体的产生。表型分布用以评价细胞亚型的平衡。还可通过单细胞受体库分析，确定感兴趣的记忆性 B 细胞亚群的体细胞高频突变的存在。B 淋巴细胞通过其受体识别抗原，参与机体免疫防御、免疫监视及免疫自稳的功能。B 细胞受体（BCR）是由重链和轻链组成的膜免疫球蛋白，其 N 端可变区的结构具有多样性，组成了能与成千上万种抗原结合的抗原识别受体库（repertoire）。经重排形成的 BCR 在特定的条件下还可以再发生新的重排或突变，使其结构发生改变，从而使其原有的抗原受体特异性向其他特异性漂移或发生亲和力的变化。B 细胞发生新的重排或突变，这类一方面是可能给那些尚未完全更新的抗自身抗原细胞继续纠正的机会；另一方面，也是更为重要的，是使免疫系统能更适应于对外来抗原的反应（Butler and Zhao，2009）。B 细胞的抗原受体多样性是由其决定抗原受体结构的基因发生重排而产生的，可通过反转录、巢式 PCR 扩增和 PCR 产物直接测序进行检测。

第三节　B 淋巴细胞的分化发育鉴定

从多能造血干细胞向 B 细胞分化发育必须经历一系列高度有序的过程。在小鼠，这一过程在出生前发生在胎肝（胚胎小鼠 14d 或胎儿 8～9 周）的造血细胞岛（islands of haemopoietic cell）中。当出生后 B 细胞的发育分化过程主要可分为前 B 细胞、不成熟 B 细胞、成熟 B 细胞、活化 B 细胞和浆细胞 5 个阶段。其中前 B 细胞和不成熟 B 细胞的分化是抗原非依赖的，其分化过程在骨髓中进行。抗原依赖阶段是指成熟 B 细胞在抗原刺激后活化，并继续分化为合成和分泌抗体的浆细胞，这个阶段的分化主要是在

外周免疫器官中进行的。成熟的B细胞主要定居于淋巴结皮质浅层的淋巴小结和脾脏的红髓和白髓的淋巴小结内。B细胞在抗原刺激下可分化为浆细胞，合成和分泌免疫球蛋白，主要执行机体的体液免疫（humoral immunity）。

一、从造血干细胞到B淋巴细胞的分化鉴定

造血干细胞（HSC）能够通过自我更新和多向分化这两种主要特性维持机体血细胞的产量。普通淋巴祖细胞（common lymphoid progenitor，CLP）是从造血干细胞分化而来的，也具有多向分化的潜能，能够分化为B、T和NK细胞，但缺乏红系分化能力，不具有自我更新能力。HSC和CLP都能在成体的骨髓中被发现，并通过与分泌局部细胞因子的基质直接作用进一步分化（Kawamoto and Katsura，2009）。

HSC在人胚胎2周时可出现于卵黄囊，第4周开始转移至胚肝，妊娠5个月后，骨髓开始造血，出生后骨髓成为干细胞的主要来源。在正常情况下，大多数多能干细胞处于静止状态。但机体需要时，其中一部分分裂增殖，以维持多能干细胞数量的相对恒定；另一部分则增殖分化，发育为定向干细胞。胚胎和成人的HSC和CLP都能在体外分化为多能造血细胞系，这种发育与培养体系内的可溶性生长因子的存在密切相关。B细胞需要某些未确定的存活和（或）增殖信号，所以如果没有基质细胞的存在，多能造血干细胞前体，就不能在上清培养体系中有效地产生B细胞。

在体外培养体系中需要注意，无论是来源于胎肝还是来源于骨髓的定向B细胞前体，都不能在无外源性生长因子的NIH-3T3滋养层细胞上增殖；而OP9在维持髓系细胞发育方面的能力较S17弱；在第5天时半量换液，每孔重新补偿100～150μl只含有Flt3-L和IL-7的新鲜培养基，不含kL，因为kL浓度过高会更有利于肥大细胞的发育，从而使培养体系中肥大细胞占多数。

（一）支持B细胞分化发育的基质细胞系的培养

B细胞需要某些未确定的存活和（或）增殖信号，所以如果没有基质细胞的存在，多能造血干细胞前体就不能在上清培养体系中有效地产生B细胞（Mueller and Germain，2009）。目前体外成功使用的小鼠骨髓基质细胞系为S17和OP9。S17能够支持HSC向B淋巴细胞系、髓系和红系分化。OP9来源于*op/op*小鼠骨髓，缺失巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF），不支持巨噬细胞生长，从而减弱淋巴细胞扩增。但OP9能够产生IL-15，是NK细胞发育所必需的，从而与OP9共培养的造血多能干细胞能够分化为大量的B细胞和NK细胞前体。OP9在诱导HSC向B细胞发育的效率要比S17高30%。

定向的B细胞前体（committed B-cell precursor）与周围基质的相互作用并不需要一种特殊的细胞系，实验发现，使用纤维原细胞NIH-3T3能够代替共培养体系中的经典的基质细胞。由于NIH-3T3不能产生支持B细胞分化发育的因子，所以使用纤维原细胞能够提供培养体系中细胞因子更好的对照。

S17、OP9和NIH-3T3均能在含OptiMem、15%胎牛血清（FCS）、1%抗生素和5×10^{-5}mol/L β-巯基乙醇的37℃，5% CO_2培养箱中扩增和维持生长。基质细胞用含

有 4ml 胰酶的 EDTA 从培养瓶中消化下来，约需 4min，细胞被收集，并用含 5%的 FCS 的 HBBS 液洗一遍，再用 1ml 的完全培养基（OptiMem、10%FCS、1%抗生素）重悬。基质细胞用台盼蓝稀释后计数，S17 和 OP9 调整细胞终浓度为5×10^4个活细胞/ml，NIH-3T3 为 1×10^5 个活细胞/ml。96 孔平底板每孔约 50μl 细胞悬液或 24 孔板每孔 500μl。铺好的基质细胞在 37℃过夜。铺好的基质细胞培养板需在共培养前 1d 准备好。

（二）B 细胞分化的体外培养环境

在造血干细胞铺到共培养体系之前，铺好了基质细胞的培养板需要照射以抑制细胞增殖。照射剂量为 10Gy。以一定的细胞密度用完全培养基重悬造血细胞前体。每孔加 50μl 细胞悬液铺于基质细胞层上。最后，每孔加 100μl 含有生长因子的完全培养基补充终体积到 200μl。

IL-7 是体外培养 B 细胞所必需的，此外，Flt3-L 和 kL 也能增强 B 细胞的存活。基质细胞系能够分泌造血细胞所必需的细胞因子。不同的基质细胞系分泌不同的细胞因子，可能是由于骨髓基质的多样性，也可能由于建系过程中表观遗传学的改变。尽管 S17 基质细胞能够支持 B 细胞前体的分化和扩增，但在体外扩增时无法检测到 IL-7。而 OP-9 细胞不能产生 M-CSF 和 Flt-L，但能表达一定数量的 kL 和 IL-7。NIH-3T3 细胞不能支持定向 B 细胞前体的扩增。

目前最常用的培养方法是在培养体系中加入 Flt3-L、IL-7 和 kL，以提供增殖和分化的适宜环境。所配制的生长因子的浓度是终浓度的 2 倍，每孔加 100μl。在这种情况下，多能造血前体细胞能够向淋巴系、髓系和红系分化。

整个过程持续在 37℃，5% CO_2 培养 12～14d。使用多孔移液器在液面稍下方小心吸取，不要吸走正在分化发育的造血细胞。到培养的晚期，可用流式细胞仪分析共培养体系中的细胞情况。最近，TSLP 也被发现是另一种独特的 B 细胞生长因子，较 IL-7 而言，更能诱导 B 细胞前体的成熟亚群。

（三）B 细胞在体外培养体系中的发育

B 细胞前体在体外能够大量扩增，如果其来源于胚胎组织，则能够产生大量的小而圆的淋巴细胞克隆（约 10^7 个细胞）。如果起始的细胞群为 HSC，则在第 10 天时会出现 $CD19^+$ 细胞，而如果起始细胞为 CLP，则在培养到第 5 天时能够产生 $CD19^+$ 细胞。随后，$CD19^+$ 细胞能够分化为 IgM^+ 细胞，在此阶段，细胞能够对脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）起反应。在此后 8～10d 通过 ELISA 能够检测到培养上清中的 IgM。成熟 B 细胞在体外不易发育，大部分保留其未成熟的表型。培养骨髓来源的 B 细胞前体，能够维持很长时间的 $CD19^+IgM^-CD43^+$ 细胞的扩增。这种现象在培养主动脉-性腺-中肾区（aorta-gonad-mesonephros，AGM）（哺乳动物体节期胚胎自主产生 HSC 的主要造血组织）来源的 HSC 时表现尤为明显。

已发现使用 OP9 和外源性的 kL、Flt3L 和 IL-7 能够持续培养胚胎 HSC 多达 40d。在培养到第 10 天的时候，已经能够检测出 CD19 的表达，但是 IgM^+ 细胞仅能在第 19

天和第 30 天期间才能被检测到。如果继续培养，IgM^+ 细胞则不能再被检测到。在这个时间节点上，表型分析发现表达 $CD19^+CD43^+$ 的祖 B 细胞含量增加，并对 LPS 无反应性。B 细胞前体细胞继续扩增 4 周以上，并表现为 $D\text{-}J_H/V_H\text{-}D\text{-}J_H$ 重排比率比 IgM^- 骨髓细胞高 5 倍。这些结果提示，细胞的累积并不是发生在前 B 细胞和后期 B 细胞的分化阶段，而是主要通过下调免疫球蛋白位点重排所需蛋白质或通过控制发生非产出性重排细胞的存活进行调节。

（四）体外培养体系中 B 细胞发育状态的表型分析

在经过 2 周培养后，每孔细胞被收集，标记谱系特异性（lineage-specific）的表面标志后进行流式分析：用 CD19 标记淋巴 B 细胞，Mac-1 标记髓系细胞和 Ter119 标记红系细胞（参照第二十五章相关内容的具体操作步骤）。

二、B 淋巴细胞在骨髓和脾脏中分化发育的检测

从多能干细胞向 B 细胞分化发育必须经历一系列高度有序的过程。在小鼠，这一过程在出生前是发生在胎肝，当出生后即在骨髓内分化成熟。在最近 15 年内通过对突变小鼠的研究，发现此过程能够被打断。如不能有效进行免疫球蛋白基因位点重排的重症联合免疫缺陷小鼠［severe combined immunodeficient（SCID）mice］，就无法产生重链或轻链蛋白。通过多参数流式细胞技术对这些小鼠和它们的相应野生型对照组的不同细胞表面表型特点的仔细比较，能够更好地理解这一过程的逐步发展模式（LeBien and Tedder，2008）（表 5-3）。

表 5-3　小鼠骨髓内从造血干细胞向 B 细胞分化发育过程中细胞表面标志的改变

	HSC	MLP	CLP	GL-Pro-B	DJ-Pro-B	Pre-B early	Pre-B late	NF B	Fo B
AA4.1	+	++	++	++	++	++	++	++	
B220				+	++	++	+++	+++	++++
CD43	++	++	++	++	++	++			
CD24	+	+	++	++	+++	++++	++++	++++	++
BP-1						++	++		
c-kit	++	++	++	++	++	++			
Il-7Rα			++	++	++	++	++		
CD19					++	++	++	++	++
CD25						++	++		

注：HSC，造血干细胞；MLP，多细胞系祖细胞；CLP，普通淋巴细胞祖细胞；GL-Pro-B，germline Pro-B，胚系祖 B 细胞；DJ-Pro-B，DJ 重排祖 B 细胞；Pre-B，合成 Igμ 链前 B 细胞；NF B，新生成 B 细胞；Fo B，滤泡内再循环 B 细胞。

B 细胞在骨髓内分化各阶段的主要变化为免疫球蛋白基因的重排和膜表面标志的表达。B 细胞的细胞膜上有许多不同的标志，主要是表面抗原及表面受体。这些表面标志都是结合在细胞膜上的巨蛋白分子。将 B 细胞的整体发育过程的关键步骤特征化也有

助于进一步深入研究 B 细胞的发育和分化。

较为粗略的小鼠骨髓细胞分类方法是使用 4 色流式细胞仪，将表达 CD45R/B220 的细胞命名为 A 类细胞，但如果只是用 CD45R 和 B22 标记而缺少 CD24，则可能污染非 B 细胞系。一种更完整的分析早期细胞类别的方法是使用 10 色分析法（9 种表面标记和 PI -死细胞标记）进行鉴定。

前体细胞的谱系分化潜能可通过回输这些细胞到免疫缺陷或辐射过的宿主体内进行检测。淋巴移植最常用的模型是已被轻度照射（300～400rad）的 SCID 或 Rag 缺陷小鼠。检测骨髓/淋巴移植是使用致死剂量照射的 Ly5-基因小鼠模型，并可通过流式表型分析、甲基纤维素培养法、基因表达检测和 B 细胞周期状态检测进行功能检测。

在以下的内容中，主要介绍分析这些不同阶段的多种方法，以及对不同发育阶段 B 细胞的鉴定、分离和功能检测方法。

材料与试剂

B2 20/CD19/IgM/IgD/CD21/CD23/AA4.1/CD24/CD43（S7）/CD5 荧光标记抗体

添加了 MethoCult® （StemCell）生长因子的甲基纤维素培养基

RNA 抽提试剂盒

逆转录试剂盒

PCR 试剂

固定和穿孔试剂盒（Cytoplasmic staining：Caltag Fix and Perm Kit，GAS-003）

细胞裂解缓冲液

上样缓冲液

聚丙烯酰胺凝胶

PI

BrdU

多色流式细胞分选仪

步骤

1. 单细胞悬液细胞的制备和分离

方法同前。

2. B 细胞流式抗体标记方法

1）将选择好的试剂用标记液稀释到适合的浓度。

2）将配好的标记液每孔 25μl 加入到 96 孔板中。

3）将细胞 20μl 每孔（细胞数）加入到 96 孔板内，冰浴 20min，用标记液洗 3 次，第一次洗用 100μl，后 2 次用 150μl。

4）280*g* 离心 3min。

5）细胞沉淀用 100μl 的标记液重悬，移入流式分选管（Falcon 2052）中。再加入 25μl 的 10×PI（10μg/ml）。

3. 骨髓内B细胞各发育阶段的细胞表面标记的流式分析

4色或5色流式细胞仪分析

B细胞是由骨髓内多能干细胞分化而来，在骨髓内的发育，可经过祖B细胞（pro-B cell）、前B细胞（pre-B cell）、不成熟B细胞（immature B cell）、成熟B细胞（mature B cell）4个阶段，为抗原非依赖阶段。成熟B细胞离开骨髓进入周围免疫器官，构成B细胞库，在此阶段经抗原刺激后，可继续分化为合成和分泌抗体的浆细胞，即抗原依赖的分化阶段（Hardy and Hayakawa，2001）。在这些不同分化阶段的B细胞，可表达较为独特的细胞表型。

最早期的B淋巴细胞分化阶段：使用B220（6B2）/CD19/AA4.1/Ly6c标记，用以划分前祖B细胞（胚系祖B细胞）为$B220^+CD19^-AA4^+/Ly6c^-$细胞。

中间阶段：使用B220/CD43（S7）/CD24/BP-1标记，其中$B220^+CD43^+$细胞被分为CD24中等$BP\text{-}1^-$和$BP\text{-}1^+$，从而区分于CD24高$BP\text{-}1^+$细胞。

后期阶段：使用B220/CD43（S7）/IgM/IgD或B220/CD43（S7）/IgM/AA4.1标记，其中$B220^+CD43\ (S7)^-$细胞被分为IgM^-和IgM^+。IgM^+细胞被分为缺乏IgD表达（或表达AA4.1）的未成熟细胞和表达IgD（或不表达AA4.1）的成熟再循环细胞。

外周阶段：使用IgM/CD21/CD23/AA4.1标记，其中IgM^+细胞被分为较早期$AA4^+$阶段和更成熟的$AA4^-$阶段。$AA4^+$阶段被进一步划分为较早期的$CD23^-$和较晚期的$CD23^+$亚群。$AA4^-$阶段被再划分出$CD23^+CD21^+$滤泡成熟B细胞、$CD23^-CD21^{low}$B-1类B细胞和$CD23^-CD21^{+++}$边缘区类B细胞。

8色或12色流式细胞仪分析

最早期的B淋巴细胞分化阶段：使用Mac1（CD11b）/GR1/Ter119/Ly6c/CD19/CD3/IgM/CD24/AA4.1/cKIT/IL-7α/B220（6B2）标记，这种组合方式能够很好地划分CLP和表型A类阶段细胞（表5-3），排除表达Mac1（CD11b）、GR1、Ter119、Ly6c、CD19、CD3、IgM的细胞，选择表达AA4.1并低表达CD24细胞；显示cKIT/IL-7Rα，从而选择中度表达cKIT和$IL\text{-}7R\alpha^+$的细胞。显示B220：缺少B220表达的是CLP；而表达B220的是表型A类阶段细胞。

中间阶段：使用Mac1（CD11b）/GR1/Ter119/Ly6c/CD3/CD24/AA4/CD19/CD43/BP-1/IgM标记，排除了表达Mac1（CD11b）、GR1、Ter119、Ly6c、CD3的细胞；选择表达AA4.1和CD19的细胞；IgM^-CD43^+的细胞表达中等水平的HAS能够被进一步划分为$BP\text{-}1^-$和$BP\text{-}1^+$两个亚群；表达有最高水平的HSA的细胞主要为$BP\text{-}1^+$；IgM^-CD43^-细胞是小前B细胞；IgM^+CD43^-细胞能够再被分为$AA4.1^+$的新形成未成熟B细胞和$AA4.1^-$的成熟再循环B细胞。很少有IgM^+CD43^+B细胞属于B-1型B细胞亚群。

外周阶段：使用B220/CD19/IgM/IgD/CD21/CD23/AA4.1/CD24/CD43（S7）/CD5标记；其中$CD19^+IgM^+$的表达用以划分B细胞群。未成熟的AA4的表达可分为$AA4^+$和成熟的$AA4^-$阶段。这些主要的细胞群能够通过CD23和CD21被进一步划分。其他的表面标志能够有效地进行这些主要亚群的异质性分析，从而能够

更好地鉴定这些亚群。

4. 分选所需的前体 B 细胞亚群

根据不同发育阶段 B 细胞的表面标志，流式分选所需的前体 B 细胞亚群到 0.4ml 的完全培养基中。

5. 回输分选所得的前体 B 细胞亚群

1）在注射前 1d 照射受体鼠。对于 CB17 SCID 或 Rag1-缺失（BALB 背景）小鼠剂量是 300rad；对于 Ly5-基因小鼠（C57B/L6 背景）的照射剂量是 900rad。在小鼠的饮用水中使用新霉素多粘菌素 B 溶液。

2）将分析所得的前体 B 细胞于 4℃，300*g* 离心 10min。

3）用 PBS 重悬前体 B 细胞，以每只小鼠 0.2ml 的注射剂量计算。针对 Ly5-基因小鼠（C57B/L6 背景）回输，必须包括 10^5 个宿主骨髓细胞。

4）在静脉注射前，用加热灯给小鼠加温约 5min，扩张血管，利于进针。

6. 从被回输前体 B 细胞的受体小鼠体内收集前体 B 细胞

在回输不同的前体 B 细胞后的第 3 周，收集骨髓、脾脏、胸腺、腹腔冲洗液和淋巴结等组织制备细胞悬液，若回输的是更初始的祖细胞，则需在 4～8 周后收集，以利于细胞的分化。

7. 对回输的前体 B 细胞的谱系分化潜能功能检测

可通过流式表型分析、甲基纤维素培养法、基因表达检测和 B 细胞周期状态检测进行 B 细胞回输功能鉴定。方法如下。

流式表型分析

通过流式分析 B 细胞的表型检测回输了不同阶段的 B 细胞后小鼠体内 B 细胞的分化发育情况。流式抗体标记方法同前（参照第二十五章流式细胞术的具体操作步骤），不同阶段表型见表 5-3。

甲基纤维素培养法

甲基纤维素是胶状基质，增加了培养基的黏度，又不会使培养基变成固体，基质本身不会对细胞的生长分化产生影响，易于单个造血干祖细胞分化的细胞聚集形成集落。甲基纤维素除了有利于粒系/巨噬系集落形成外，还有更适合红系集落的生长的特点。因此，用含有甲基纤维素和各类细胞因子的培养基进行培养能够用来检测分选细胞的 B 细胞系的分化能力。

使用添加了 MethoCult®（StemCell）生长因子的甲基纤维素培养基。根据说明书将培养基解冻，避免在液体中形成气泡。用 16-gage 的注射器等分液体，每管 3ml，在使用前冰冻储存。在冰箱或室温过夜解冻。

用甲基纤维素培养法检测 B 细胞在发育分化过程中的不同的集落形成能力，步骤如下。

1）用 0.3ml Iscove's 培养基（2%FBS）重悬的 10^4～10^5 个细胞，加入到 3ml 的 MethoCult®培养基中，用其中的 1.1ml 铺到 35mm 的培养皿中。在细胞加入前，振荡，并将气泡赶走，约 5min。

2）轻轻旋转培养皿，使培养基均匀地涂布于皿底。

3）在37℃，5%CO_2的孵箱内培养12d，显微镜观察集落形态。

基因表达检测

B细胞不同发育分化过程基因表达可通过RT-PCR、胞内染色、Western印迹的方法在RNA和蛋白质水平进行检测。由于通过分选获取细胞样品的数量有限，所以不能使用传统的Northern印迹分析。而RT-PCR能够5～10倍地放大基因表达的变化，所以可被用来半定量B细胞发育分化过程基因的表达变化。若使用放射标记的探针，能够更加敏感地评价RNA水平的细微变化。蛋白质水平的变化可通过荧光染料标记的抗体进行胞内染色，需要结合表面染色，但是标记效果不一定理想，有时自发荧光的背景也会增加。Western印迹检测的效果要比胞内染色更明确，但是至少需要10^6个细胞。

a. RT-PCR实验方案。

提取收集到的发育分化过程中不同阶段的B细胞的RNA，进行cDNA合成，再用PCR扩增，主要检测dTd、λ5、Rag1、bcl-2、MB1等在B细胞谱系发育中发挥重要作用的基因的表达情况的变化。

b. 胞内染色实验方案。

1）使用固定和穿孔试剂盒，包括固定剂和打孔剂，将分选到的细胞离心（5×10^4～5×10^5个细胞）。

2）加入50μl固定剂。

3）室温孵育15min。

4）用1ml PBS洗一遍。

5）加入50μl打孔剂，其中混合有合适浓度的dTd、λ5、Rag1、bcl-2、MB1等的标记抗体（表5-3）。

6）室温孵育15min。

7）用1ml PBS洗2次。

8）用150μl PBS重悬B细胞，移入流式管中，流式分析不同阶段B细胞的dTd、λ5、Rag1、bcl-2、MB1等的蛋白质水平变化。

c. Western印迹实验方案。

1）收集分选的不同阶段的B细胞，用PBS洗2次，离心，弃上清。

2）用1×细胞裂解缓冲液（10^6个/20～40μl），其中含有蛋白酶和磷酸酶的抑制剂，冰浴15～20min。

3）4℃下8800g离心5min。

4）收集上清，弃沉淀。

5）加入1/6的6×上样缓冲液，煮沸5min，样品可短时间储存在4℃。

6）配置聚丙烯酰胺凝胶，电泳，转膜，孵一抗，用辣根过氧化物酶标记的二抗和显影液进行B细胞的dTd、λ5、Rag1、bcl-2、MB1等分子蛋白质水平检测。

B细胞周期状态检测方法

细胞周期各时相的DNA含量均不相同，正常细胞G_1/G_0期具有二倍体细胞的

DNA 含量，而 G_2/M 期具有四倍体细胞的 DNA 含量，S 期的 DNA 含量则介于二倍体和四倍体之间。B 细胞周期状态可通过 PI（碘化丙锭）染色或 BrdU（bromodeoxyuridine，溴化脱氧尿嘧啶）掺入法进行检测。

PI 可以结合 B 细胞内的 DNA 和 RNA，可用 RNA 抑制剂将 RNA 消化后，通过流式细胞术检测与 DNA 结合的 PI 的荧光强度，可直接反映 B 细胞内 DNA 的含量。PI 不能通过细胞膜完整的细胞（如活细胞和早期凋亡细胞），因此在标本制备时，需先用冷乙醇或其他破膜剂增强细胞膜的通透性，使 PI 进入细胞内与细胞内的 DNA 结合。因此，通过 PI 染色法流式检测 B 细胞内 DNA 含量时，可以将细胞周期各时相区分为 G_1/G_0 期、S 期和 G_2/M 期，并计算出各时相的百分率（PI 染色法的具体操作步骤参照第二十五章相关内容）。

BrdU 属于 DNA 结合型荧光染料，可作为胸苷类似物，通过竞争掺入新增殖细胞 S 期单链 DNA 核苷酸序列替代胸腺嘧啶。与胸腺嘧啶竞争掺入的强度可能与细胞增殖异常有关。BrdU 会随着 B 细胞分裂而不断被“稀释”，最终完全不能检出，因而不适合做长时期的体内标记追踪。所以评价 B 细胞内最近合成的 DNA 的量可通过 BrdU 进行检测。BrdU 掺入可同时进行不同阶段 B 细胞的表面标记，若分选的 B 细胞能够到达 10^5 个细胞，则 BrdU 掺入法能够获得更清晰的结果（BrdU 掺入法的具体操作步骤参照第二十五章相关内容。

三、B 淋巴细胞在外周免疫系统中的成熟过程检测

在成年阶段，B 细胞在骨髓内由造血干细胞（HSC）产生，这个发育过程可分为很多阶段，主要是通过表达 BCR 和其他分子进行区分。只有当 B 细胞产生具有信号转导功能的 BCR 时，才能对骨髓微环境来源的生长因子产生适当的反应，从而进行正常的分化。

B 细胞离开骨髓时，功能尚未成熟，处于过渡 1 阶段（T1 阶段）。当随着血流进入脾脏时，B 细胞逐步发育为过渡 2（T2）、成熟（M）和边缘区（MZ）细胞（Bleesing，2004）。和在骨髓内的情况一样，在脾脏中的分化发育也需要通过微环境来源的因子对 BCR 的信号功能的调节。

通过流式细胞仪对 B 细胞在外周的成熟过程进行精确的区分和定性，主要通过两种方法：一种是对 B 细胞成熟过程中改变和节点的鉴定；另一种方法是分选离开骨髓处于成熟发育的不同阶段的 B 细胞，通过正常和突变的小鼠，了解其分子和基因的改变。

通过对多种在分化发育时独特表达的表面标志的组合分析，才能鉴定 T1、T2、MZ 和 MB 细胞（表 5-4）。其中，最佳的组合为表面免疫球蛋白 IgM 和 IgD、补体受体 2（CD21）和 IgE 的低亲和力受体（CD23）。biotin 标记的抗体需在 streptavidin 标记的荧光素之前标记。若同时加入，则多余的抗体和荧光素会立即反应，而细胞无法进行标记。需要注意的是 CD23 是最弱的标志。最初均使用最小剂量的荧光素标记，以避免空间位阻。FITC、biotin、PerCP 和 Cy5 是小分子，而 PE、APC 和所有的串联共轭体都是大分子。用最强的荧光素标记较弱表达的分子标志，PE、Cy5 和大部分的串联共轭体荧光都很强，而 PerCP 很弱。所以需要通过预实验了解成熟过程中的 B 细胞表面标志的表达丰度。

表 5-4　脾脏内不同 B 细胞亚群的表型和分布

表型	T1	T2	M	MZ
sIgM	+++	+++	+	+++
sIgD	−	+++	+++	−
CD23	−	++	++	−
CD21	−	+++	++	+++
HSA	+++	+++	+	+
CD62L	−	+	++	−
493	+	+	−	−
定位	PALS 区外围的红髓	滤泡	滤泡	边缘区

四、B 淋巴细胞的迁移检测

B 细胞通过血流循环到次级淋巴器官的 B 细胞富集区。一旦与抗原相遇，B 细胞会改变它们的迁移目的地而向有利于和抗原特异性 T 细胞相遇的地方迁移。B 细胞进入滤泡，与抗原特异性 T 细胞发生相互作用后，能够直接分化为浆细胞或进入生发中心。在生发中心的 B 细胞经历克隆增殖、抗体可变区的体细胞高频突变、受体编辑、抗体类别转换、抗体亲和力成熟等过程，最终分化为记忆 B 细胞或浆细胞前体，离开生发中心。浆细胞前体仍留在器官的淋巴组织内或离开继而定位于骨髓或肠道。控制这些迁移模式的主要是其他细胞分泌的趋化分子，从而提供给迁移的 B 细胞"信号灯"的作用（Allen and Okada，2007）。

静息的 B 细胞为圆球状，但再次接触到趋化因子时，这些细胞会迅速发生不规则的突起，又迅速缩回皱褶。单个细胞的微丝系统迅速重组丝状肌动蛋白（F-肌动蛋白）积累在毗邻的细胞膜上。在接下来的几分钟，细胞采用了两极化（头对尾）形态，其中聚合肌动蛋白集中在细胞的前部。其后是细胞体，包括核和细胞器，它们往往呈锥形，被称为尾肢。细胞是通过前部的运动决定迁移的方向。

由于 B 淋巴细胞运动很复杂，需要应用多参数分析才能充分了解其对趋化因子的反应。暴露于趋化因子的早期生化事件可被检测，包括测量钙流、用适当的绿色荧光融合蛋白观察前部的位置变化和 F-肌动蛋白的形成。渗透法常用以确定细胞群中哪部分细胞发生了趋化反应，但此方法提供的如反应细胞的移动速度等信息量很少。可视化分析包括趋化梯度的方向检测，可以提供趋化反应的直接证据。虽然根据琼脂迁移，中性粒细胞可被随时可视化，但是在类似的实验中，B 淋巴细胞不能进入显微镜幻灯片和琼脂之间的空间。虽然很少使用可视化方法观察 B 细胞迁移，但三维基质法（由胶原或纤维制成）常常被用来研究 T 细胞迁移。这些体外实验往往能够为体内实验检测 B 淋巴细胞迁移到特定部位的能力提供必要的补充（Okada and Cyster，2006）。体外实验检测 B 淋巴细胞的迁移能力，主要可通过趋化小室法（检测小鼠 B 细胞的迁移最好选用 5μm 孔径的 Transwell 小室）、FITC-鬼笔环肽标记法、Zigmond 小室法进行检测。

体液免疫应答的早期阶段，与抗原结合的 B 细胞为了接近 Th 细胞，在次级淋巴器官内快速改变自身的位置。然而针对某种特定抗原的特异性 B 细胞极少，这么少的细

胞是如何接触到其特异性的抗原、这些抗原特异性的B细胞和T细胞又是如何找到对方并启动T细胞依赖的抗体免疫应答的，我们只了解了一部分。目前可应用实时双质子显像技术对完整淋巴器官开展体内研究，将B细胞与抗原结合前后的迁移运动过程分开。但是其设备昂贵，尚未得到普及。目前有两种类型的染料可以用来体内追踪细胞，分别是内染料CFSE（终浓度为1.25μmol/L）和亲油性示踪剂，如脂溶性carbocyanines DiI、DiO、DiD和DiR。CFSE能稳定掺入细胞，可用于监测短期和长期（数月）的B细胞迁移和分化。如果分析是在回输超过24h后进行，需使用更高浓度的CSFE（5μmol/L）标记。亲油性染料能够和细胞膜融合，可用于在体内较长期地示踪细胞。如果可能的话，可使用不匹配的等位基因标记，如Ly5a/B或Ly9.1监测供体的淋巴细胞。目前体内实验主要是通过CFSE或亲油性示踪剂追踪B细胞的迁移过程，以及应用组织细胞流式分析或荧光显微镜分析组织切片评估细胞迁移能力的方法。其中组织细胞流式法可用以分析回输的示踪B细胞迁移到次级淋巴器官的种类、比例及功能状态。荧光显微镜组织切片法可用以直观分析回输的示踪B细胞迁移到次级淋巴器官的组织定位和与周围细胞的相互关系。

第四节　B细胞的功能分析

B细胞主要介导机体的特异性体液免疫应答。B细胞免疫应答可分为对TI抗原（胸腺非依赖性抗原）的免疫应答和对TD抗原（胸腺依赖性抗原）的免疫应答。B细胞对TD抗原的应答包括以下过程：首先B细胞通过其表面的BCR识别并结合抗原，导致BCR的交联，经Igα-Igβ传入B细胞活化的第一信号，启动信号转导的级联反应。T细胞或细胞因子提供B细胞活化必需的第二信号，没有第二信号，活化B细胞不能增殖和分化。活化的B细胞一部分增殖，分化为浆细胞，这些浆细胞大多数在两周内凋亡。另一部分B细胞移至滤泡，并继续增殖形成生发中心，生发中心的部分B细胞经过体细胞高频突变、抗原受体亲和力成熟和Ig类别转换等过程，最终分化为抗体亲和力成熟的浆细胞和记忆性B细胞。TI抗原如细菌多糖、LPS等能激活初始B细胞诱导抗体产生，无需T细胞辅助。

B细胞的功能状态部分反应了机体的免疫状态，对B细胞功能的研究可为临床疾病的发生机制、诊断和治疗提供依据，可为基础理论的研究提供一定的实验依据。本节介绍B细胞的活化、增殖及检测的方法，免疫球蛋白类别转换的诱导及鉴定，生化中心和浆细胞的检测，B细胞信号转导的研究方法，以及B细胞脂筏的分离方法。

一、B淋巴细胞的活化方法

B细胞在抗原、抗Ig抗体或促有丝分裂原等的刺激后，可发生活化、增殖反应。B细胞的活化过程如下：首先是B细胞表面的受体与相应的配体（抗原、抗Ig抗体等）结合，膜受体和配体结合后诱导受体介导的信号转导反应，促进相关基因的表达，使B细胞激活和增殖。活化的B细胞表面MHC-Ⅱ类分子、CD80和CD86的表达增强，可

用荧光标记的单克隆抗体检测相应分子的表达。最常用的诱导B细胞活化的物质是抗IgM抗体。其他如LPS、CD40配体（CD40L）和抗CD40抗体都能激活B细胞。

材料与试剂

纯化B细胞
抗IgM抗体
细菌LPS（*E. coli*；Difco＃011B4）
可溶性CD40L（sCD40L，R&D Systems）
抗鼠CD40抗体（R&D Systems）
96孔平底培养板

步骤

1）纯化B细胞（方法参见本章），调整B细胞浓度为10^6个/ml。
2）向每孔（96孔平底培养板）中加入100μl B细胞悬液（10^5个/孔）。
3）向B细胞悬液中加入下列刺激物之一（建议刺激剂选用3个以上不同的浓度，每种刺激物每个浓度均设3个复孔）。
抗IgM抗体：2～200μg/ml。
LPS：1～100μg/ml。
sCD40L：0.03～0.1μg/ml。
抗CD40抗体：0.2～0.5μg/ml。
向96孔培养板中加入100μl DMEM完全培养基作为阴性对照（3个复孔）。
4）将培养板置于37℃，5%CO_2细胞培养箱中培养24～72h，即可得到活化B细胞。
5）如需检测活化B细胞表面MHC-Ⅱ类分子、CD80和CD86的表达参见第二十五章相关内容。如检测B细胞的增殖，参见本章。

注意事项

1）根据实验需要，可选择不同的刺激物。
2）应在正式实验前进行预实验，摸索刺激物的最适剂量和最佳刺激时间。

二、B淋巴细胞的增殖检测

B细胞在受到抗原等特异性或非特异性的刺激后，可导致细胞发生活化、增殖反应。B细胞增殖反应的检测在一定程度上反映了B细胞的功能状态，且检测方法简便、可靠。因此，目前仍被广泛应用。

（一）^{3}H-胸腺嘧啶核苷（^{3}H-TdR）掺入法

胸腺嘧啶核苷（TdR）是DNA合成的必需物质，利用同位素^{3}H标记TdR，作为DNA合成的原料能掺入新增殖的细胞染色体中，通过测定细胞的放射性强度可以反映细胞的增殖情况。该方法灵敏度高，但是具有放射性且需要液闪仪。

材料与试剂

0.1mCi/ml 溶于 HBSS 的 ^{3}H-TdR

多道细胞收集器

液闪仪

步骤

1）选用合适的刺激物活化 B 细胞（参见本章）。

2）每孔中加入 100μl 0.1mCi/ml ^{3}H-TdR，继续培养 16h。

3）用多道细胞收集器将细胞收集到玻璃纤维滤纸上。

4）依次用 PBS、5%三氯乙酸和无水乙醇洗涤细胞各 3 次以去除游离的 ^{3}H-TdR。

5）将滤纸在 80℃烘箱中烘干 30min。在液闪仪上检测 cpm。

6）Δcpm 值：刺激组 3 个复孔的 cpm 的平均值减去对照组 3 个复孔的 cpm 的平均值，得出刺激组的 Δcpm 值。刺激指数（SI）：刺激组 3 个复孔的 cpm 的平均值除以对照组 3 个复孔的 cpm 的平均值。

注意事项

1）^{3}H-TdR 方法检测时，有时样品间标准差较大，应在细胞收集和洗涤环节认真处理，以保证样品的均一性。

2）每批实验都应固定掺入时间和掺入量，以保证实验的可重复性。

（二）CFSE 检测 B 细胞增殖

CFSE 能够扩散进入细胞，在胞内酯酶的作用下转变为阴离子化 CFSE，与胞内蛋白赖氨酸侧链及可利用的氨基发生不可逆结合，从而标记到细胞蛋白质上。当细胞进行分裂增殖时，CFSE 被平均分配到第二代细胞中，这样与第一代细胞相比，其荧光强度便会减弱一半；以此类推，分裂得到的第三代细胞的荧光强度便会比第二代细胞减弱一半。在 488nm 的激发光下，采用流式细胞仪检测分析，检测到细胞荧光强度不断地降低，进一步分析得出细胞分裂增殖的情况。通过这一方法，6～8 代不同步分裂的 B 细胞能够被鉴别出来。

材料与试剂

纯化的静息 B 细胞

5mmol/L CFSE 贮存液

步骤

1）调整 B 细胞密度为 1×10^{7} 个/ml，加 CFSE 至细胞中，终浓度为 5μmol/L，室温孵育 2～5min。

2）加 40ml PBS/BSA 或含 FCS 的培养液中止标记反应。

3）4℃下 350*g* 离心 10min。将细胞重悬于预温的培养基中。

4）在体外用刺激物活化后（参见本章），流式细胞仪检测 CFSE 的荧光强度。

（三）BrdU 检测 B 细胞增殖

5-溴脱氧尿嘧啶核苷（BrdU）是胸腺嘧啶核苷的类似物，活体注射或在体外培养

的B细胞中加入BrdU，BrdU可以掺入到新增殖细胞合成的DNA中，利用荧光标记的抗BrdU单克隆抗体，通过流式检测BrdU掺入的强度，分析细胞增殖的状况（Houck and Loken，1985）。检测时需要将基因组DNA进行变性，以利于抗BrdU单克隆抗体与掺入的BrdU结合。最初是用3mol/L HCl进行DNA变性，这种方法虽然有效，但会使大多数细胞上的表面标记发生不可逆的破坏。改进的方法是用含Tween20的1%的多聚甲醛固定细胞并且使细胞膜通透性增加，用DNase Ⅰ消化基因组DNA。用这种改良的方法，在固定细胞之前可以进行细胞表面标记的染色。与^{3}H-TdR检测增殖相比，该方法简单、迅速，且无放射性污染。但是，BrdU会随着细胞分裂而不断被“稀释”，以至于最终完全不能检出。因而不适合做长期的体内标记追踪。本节重点介绍体内注射BrdU检测B细胞增殖的方法。

材料与试剂

试验鼠
1mg/ml的BrdU（Sigma）水溶液或5mg/ml BrdU PBS溶液
预先冰浴的70%乙醇
2%多聚甲醛/0.02% Tween20
DNase Ⅰ
FITC标记的抗BrdU

步骤

1）给予试验鼠含1mg/ml的BrdU和1%蔗糖的水进行喂养（按每鼠8ml/d的消耗量给水），并每天换水。或给予试验鼠腹腔注射200μl的5mg/ml BrdU（PBS配制）。可同时通过注射和饮水给予BrdU。
2）将试验鼠断颈处死，取脾脏，分离鼠B细胞。先用大鼠血清封闭，然后对细胞进行表面标记（如CD19标记）。
3）将荧光素标记过的B细胞，用PBS洗1次后，弃上清。用200μl的PBS重悬细胞。
4）将上述细胞快速打入1ml预先冰浴的70%乙醇中，避光，冰浴条件下固定30min。
5）4℃下1200g离心6min。弃上清，用500μl PBS重悬细胞，加入等体积的含2%多聚甲醛/0.02% Tween20的PBS，避光，冰浴1h以上，使细胞的通透性增加。
6）PBS洗1次，弃上清。加入1ml含50U/ml DNase Ⅰ的DNase Ⅰ缓冲液分解双链DNA，暴露BrdU，室温放置10min。
7）PBS洗1次，弃上清。加入FITC标记的抗BrdU，室温放置20min，PBS洗1次后，弃上清。加入300μl PBS，流式分析。

注意事项

1）如果是短期标记BrdU（1d或更短时间），建议选择腹腔注射，每隔6h重复注射。如果是长期标记BrdU，建议在饮水中给予BrdU，因为反复注射会使小鼠

产生应激反应。

2）如果是用 FITC 标记的抗 BrdU，那么细胞表面标记不要选择 FITC 标记抗体。

3）用多聚甲醛/Tween20 破膜时，过夜可增加 BrdU 检测的敏感性。

4）原则上 BrdU 染色可以与 DNA 染色（如 7-AAD 染色）或胞内细胞因子染色相结合。

三、免疫球蛋白的类别转换的诱导和鉴定

在免疫应答的过程中，B 细胞能够发生免疫球蛋白类别从 IgM 向 IgG、IgE 或 IgA 的转换。Ig 类别转换是以 DNA 重组事件为基础，导致编码 Ig 重链恒定区的基因片段发生交换，而 Ig 重链可变区的基因保持不变。目前关于类别转换重组的分子机制研究大多数都是基于分析体外 B 细胞诱导 Ig 类别转换。在体外，鼠和人的初始 B 细胞能被细菌脂多糖类、抗 CD40 或 CD40L 所活化，发生类别转换重组（Nakamura and Kondo，1996）。LPS 可刺激低密度（5×10^5 个/ml 或更低）培养的鼠脾脏 B 细胞经历 IgG2b 和 IgG3 的类别转换。在 IL-4 存在下，用 LPS 活化 B 细胞可诱导抗体发生 IgG1 和 IgE 的类别转换。细胞因子信号能使 Ig 向特定的类别发生转换。例如，IL-4 诱导鼠 IgG1 和 IgE 转换，人 IgG4 和 IgE 转换。

鼠初始 IgM/IgD^+ 在体外能够被分裂原，如细胞 LPS 所活化，发生 IgG3 的类别转换。这一体外系统被广泛用来分析转换细胞的频率、活化和增生与类别转换的关系、转换的次序，以及如何调控转换重组，尤其是关于能否定向转换不同的 Ig 类别，以及如何调控定向转换，是随机的还是以调控的方式。

ELISA 的方法可用于检测细胞培养上清中分泌的抗体类别（Kuhn and Rajewsky，1991）。空斑形成试验和 ELISPOT 方法可以用来检测分泌相应类别抗体的细胞数量（Sedgwick and Holt，1983，1986）。需要注意的是，在 Ig 分泌水平评价 Ig 类别转换，是非常粗略的方法。因为 Ig 的分泌包括 Ig 的类别转换和由膜结合型 Ig 向分泌型 Ig 的转换两个过程，因此，检测发生类别转换的 B 细胞和浆细胞，比较好的方法是用本节所介绍的对表面和胞内 Ig 染色的方法进行鉴定。由于浆母细胞的细胞质中含有大量的免疫球蛋白，相对于表面染色，胞内染色更为敏感。但是，胞内染色需要对细胞进行固定和穿膜。为了去除死细胞，建议使用 Ficoll 梯度离心。固定会使所有细胞都能被 PI 所渗透，因此，胞内染色时 PI 不能用来排除死细胞。

本节主要介绍分离和刺激鼠 B 细胞，利用 CFSE 标记 B 细胞，用 LPS 和相应的细胞因子诱导 B 细胞向特定 Ig 的类别转换，通过流式检测细胞表面和胞内 Ig 亚型鉴定已发生 Ig 类别转换的细胞。如有需要，可流式分选已发生特定 Ig 类别转换的 B 细胞，进一步进行细胞和分子水平的分析。

材料与试剂

10mg/ml 大肠杆菌 LPS 血清型 055：B5（Sigma，Taufkirchen，Germany）

重组 IL-4

含0.5% BSA 的 PBS（PBS/BSA），加 0.02% 叠氮钠的 PBS/BSA（PBS/BSA/

NaN_3）

4%甲醛（PBS配制）

CFSE贮存液（25mmol/L）

小鼠淋巴细胞分离液

抗鼠FcγRIIb单克隆抗体（2.4G2）

荧光标记的抗IgG1或抗IgG3

0.1mg/ml PI贮存液

步骤

1）分离并用CFSE标记B细胞（参见本章）。

2）诱导B细胞经历IgG2b和IgG3类别转换。加LPS于完全培养基中，浓度为40μg/ml，过滤灭菌。以2×10^5个/ml的初始密度，用含LPS的完全培养基培养B细胞。60h后通过表面染色检测IgG3的类别转换，3～4d后达到最高峰。

3）诱导B细胞发生IgG1和IgE类别转换。加LPS于完全培养基中，浓度为40μg/ml，过滤灭菌。加5～20ng/ml的重组IL-4至含LPS的培养基中。以2×10^5个/ml的初始密度，用上述培养基培养B细胞。60h后通过表面染色检测IgG1的类别转换，3～4d后达到最高峰。

4）IgG3（或IgG1）的胞内染色。将小鼠淋巴细胞分离液加至50ml离心管中，轻轻地将细胞加至小鼠淋巴细胞分离液上。20℃下600～700g离心20min（缓慢加速和减速）。用吸管轻轻吸取包含B细胞的不透明界面，移至新的50ml离心管中。加30ml PBS至离心管中，将离心管轻轻颠倒混匀。250g离心10min，弃上清。用PBS/BSA洗细胞2次，再用PBS洗细胞1次。用PBS调整细胞密度为2×10^6个/ml。加甲醛/PBS固定细胞，终浓度为2%。室温孵育20min。用PBS洗细胞2次。用PBS/BSA/NaN_3重悬细胞，避光保存于4℃，用于染色。350g离心细胞10min。将细胞团块用50～100μl含荧光标记的抗IgG3或抗IgG1的穿膜缓冲液重悬，4℃，避光孵育10min。用1ml穿膜缓冲液洗细胞后再用PBS/BSA/NaN_3洗细胞。用400μl PBS/BSA/NaN_3重悬细胞，转移至流式管中，流式检测。

5）IgG3（或IgG1）的表面染色。每个样品大约为1.5×10^6个细胞。350g离心细胞10min。将细胞团块用50μl含50μg/ml抗鼠FcγRIIb抗体的PBS/BSA重悬，冰上孵育15min，去除非特异性染色。加50μl含荧光标记的抗IgG3或抗IgG1的PBS/BSA至细胞悬液中，4℃下避光孵育10min。用1ml PBS/BSA洗细胞，用400μl PBS/BSA重悬细胞，转移至流式管中。在流式上样前，直接加入终浓度为1μg/ml的PI至细胞中，以排除死细胞。

注意事项

1）总的脾脏B细胞培养可用来刺激B细胞发生抗体类别转换重组，但是推荐在刺激B细胞之前纯化初始B细胞，以排除其他细胞对刺激的影响。

2）试验中 LPS 的浓度与鼠的品系有关。C57BL.10、BALB/c 或 CBA 品系小鼠都可以用。但是 C3H/HeJ 小鼠对 LPS 无反应，不能用 LPS 刺激。

3）CD40 活化型抗体刺激可以代替 LPS 刺激。例如，用 10μg/ml 抗 CD40 抗体或 CD40L 刺激 B 细胞。

4）如果固定的细胞直接用来胞内染色，那么至少在 4℃避光放置 15min，否则，结合在细胞上的仍有活性的甲醛会将抗体偶联到细胞上，增加染色的背景。

5）胞内染色需要对细胞进行固定和穿膜。固定会使所有细胞都能被 PI 所渗透，因此，胞内染色时 PI 不能用来排除死细胞。建议在胞内染色前先用小鼠淋巴细胞分离液分离得到活细胞。

四、生发中心反应和浆细胞的检测

用 T 细胞依赖抗原免疫可以诱导 B 细胞沿着两条通路发育。在 T 细胞区与已接触过抗原的 T 细胞相互作用后，B 细胞能移至 T 细胞区和红髓的边缘，发育为早期的浆母细胞，进一步分化为产生低亲和力抗体的早期浆细胞。浆母细胞和浆细胞首先在滤泡外区发育，可通过其表达的 CD138 分子进行鉴定。浆母细胞增生，开始产生胞质免疫球蛋白。几天以后，它们进一步分化为不分裂的浆细胞，并分泌大量的免疫球蛋白。2～3d后，大多数浆细胞从脾脏中消失，少部分长寿命浆细胞存活下来（Ho and Lortan，1986）。另一条 B 细胞发育的通路就是与同种的 T 细胞相互作用后，移至滤泡，滤泡中的 B 细胞源于生发中心。滤泡中的 B 细胞增生并且通过免疫球蛋白可变区高频突变以及高亲和力 B 细胞的选择，开始亲和力的成熟过程（Jacob and Kelsoe，1991）。生发中心包含许多处于细胞周期中的 B 细胞和一些 T 细胞，通过缺失 IgD 以及在滤泡状树突状细胞上出现免疫复合物可鉴别生发中心。

直接利用 T 细胞辅助可加速和同步化初始 B 细胞对半抗原的应答。用非偶联的载体蛋白免疫小鼠提供直接的 T 细胞辅助，也能诱导载体特异性的免疫球蛋白，这些免疫球蛋白在短期内将清除游离的抗原。在半抗原载体免疫的情况下，免疫后 1～4d 会诱导滤泡外半抗原特异性浆母细胞增生，而生发中心 B 细胞的增生在 3d 或更长时间后才会发生。可通过用放射性胸苷标记 S 期细胞或通过 BrdU 标记示踪长寿命浆细胞的起源。免疫应答的早期，在饮用水中给予 BrdU 可标记早期扩增的滤泡外浆母细胞，浆母细胞在免疫后 96h 停止分裂。之后生发中心的细胞继续增生，吸收的 BrdU 迅速被稀释。不同时期标记的浆细胞中的 BrdU 在组织切片中能被染色。

本节介绍了组织切片中长寿命以及短寿命的浆细胞的分析。用偶联有 T 细胞依赖载体的 4-羟基-3-硝基苯基乙酰基（NP）免疫小鼠。在脾脏组织切片中可以鉴定出在 B 细胞应答的不同阶段给予的标记有 BrdU 的浆细胞。可通过免疫组织化学的方法鉴定组织切片中抗原特异性生发中心细胞和滤泡外浆细胞。表 5-5 至表 5-7 给出了 4 种抗体的组合，可用来鉴别脾脏切片中不同的区域：T 区和滤泡可用 CD3 和 IgD 染色鉴别。生发中心为 IgD^- 区，在这个区内滤泡中含有标记有 BrdU 的增生 B 细胞和一些 T 细胞。CD138 染色位于 T 细胞区和红髓边缘的浆母细胞和浆细胞。NP 特异性的 B 细胞和浆细胞通过 NP 偶联的绵羊 Ig 鉴别，但 NP 偶联的绵羊 Ig 也可以染色生发中心中含 NP 特

异性抗体的免疫复合物。为了区别免疫复合物和生发中心中抗原特异性的B细胞，组织切片可以用NP和IgG3双染色。免疫复合物包含有NP特异性抗体和循环的IgG3的混合物，显黑色。由于IgG3主要由T细胞非依赖性抗原诱导产生，大多数NP特异性的T细胞依赖的生发中心B细胞不发生IgG3的类别转换，因此会显蓝色。然后通过显微解剖从脾脏切片中分离抗原特异性细胞。用PCR方法，利用家族特异性引物，扩增免疫球蛋白可变区基因，并对PCR产物进行DNA测序，从而鉴定从生发中心细胞发育而来的浆细胞的免疫球蛋白可变区突变。

表 5-5 免疫组化的抗体组合

第一步	第二步	第三步	用于鉴定
CD3	生物素化的兔抗大鼠	Strept AB	T区、滤泡、生发中心和红髓
IgD（绵羊）	过氧化物酶标的驴抗绵羊	Complex/AP	
CD138	生物素化的兔抗大鼠	Strept AB	浆母细胞和浆细胞
IgD（绵羊）	过氧化物酶标的驴抗绵羊	Complex/AP	
NP-绵羊	生物素化的驴抗绵羊	Strept AB	抗原特异性生发中心，B细胞
IgG3（大鼠）	过氧化物酶标的兔抗大鼠	Complex/AP	
NP-绵羊	生物素化的驴抗绵羊	Strept AB	抗原特异性B细胞，浆细胞
IgD（大鼠）	过氧化物酶标的兔抗大鼠	Complex/AP	

表 5-6 免疫组化中所用一抗

特异性	宿主种类，克隆	来源
CD3	大鼠，KT3	Serotec，Oxford，UK
CD138	大鼠，281-2	BD pharmingen，San Diego，CA
IgD	绵羊抗血清	The Binding Site，Birmingham，UK
NP-绵羊 IgG	—	制备方法见本节试剂准备步骤
IgG3	大鼠，LO-MG3-13	Serotec
IgD	大鼠，11-26c. 2a	BD pharmingen
BrdU	小鼠，Bu20a	DakoCytomation，Ely，UK

表 5-7 免疫组化中所用二抗及其耦合物

抗体特异性	宿主种类	结合物	来源
大鼠 Ig	兔	生物素或过氧化物酶	DakoCytomation
绵羊 Ig	驴	生物素或过氧化物酶	The Binding Site
小鼠 Ig	山羊	生物素	DakoCytomation
StreptABComplex/AP		碱性磷酸酶	DakoCytomation

材料与试剂

鸡γ球蛋白（chickenγ-globulin，CGG）

NP_{18}-CGG 或 NP-绵羊 Ig
BrdU（Sigma-Aldrich）
Tissue-Tek OCT 复合物（Sakura，Zoeterwoude，The Netherlands）
生物素化的 CGG
链菌素-生物素碱性磷酸酶复合物（streptavidin-biotin alkaline phosphatase complex，StreptABComplex/AP）（DAKO）
AP 底物 Fast Blue 或 Fast Red
显微操作器（Leica，Wetzlar，Germany）
裂解液：0.5mg/ml 蛋白酶 K
MinElute extraction kit（Qiagen，Crawley，UK）
测序用 ZERO Blunt TOPO PCR cloning kit（Invitrogen）
QIAprep Miniprep kit（Qiagen）

步骤

1. 试剂准备

1）CGG：用明矾进行沉淀（Chase，1967）。用无菌水溶解 CGG，浓度为 5mg/ml，然后加入等体积的 9% AlK $(SO_4)_2$（Sigma-Aldrich，Poole，UK）中。用 10mol/L NaOH 调整蛋白质/明矾混合物的 pH 为 6.5，然后室温静置 30min 使沉淀最大化。沉淀物用无菌 PBS 洗涤 2 次，使 pH 为中性。最后沉淀物用含 5×10^9 个化学灭活的百日咳杆菌（作为佐剂）的生理盐水重悬至终浓度为 250μg/ml。

2）NP_{18}-CGG 或 NP-绵羊 Ig：CGG 或绵羊 Ig 以 10mg/ml 的浓度溶于置于冰上的 0.1mol/L $NaHCO_3$ 中。NP 以 10mg/ml 的浓度溶于二甲基酰胺（DMF）中。NP 以滴定的方式加到蛋白质溶液中，边滴边搅拌，NP 与蛋白质的比例为 1∶20，室温下置于旋转混合器孵育 2h。NP 蛋白溶液可被 PBS（pH7.4）广泛透析，用 5 号透析袋。透析可将非结合的 NP 从混合物中去除。

3）生物素化的 CGG：按以下方法制备（Johnson，1989）：CGG 以 1mg/ml 的浓度溶于 0.1mol/L $NaHCO_3$ 中。（+）生物素 *N*-羟琥珀酰亚胺以 1mg/ml 溶于 DMSO 中，以 100μg 生物素∶1mg 蛋白质的比例加到 CGG 中。室温下振动器中孵育 4h。4℃条件下 CGG-生物素混合物用 PBS 加 0.1%叠氮钠，5 号透析袋透析以去除未结合的生物素。

4）Fast Blue：加 8mg 盐酸左旋咪唑（Sigma-Aldrich）至 10ml Tris-HCl（pH9.2）中；加 3.8mg 萘酚 AS-MX 磷酸盐（Sigma-Aldrich）至 340μl DMF 中；混合。再加 10mg Fast Blue BB 盐（Sigma-Aldrich），摇晃直到溶解，过滤，立即使用。

5）Fast Red：加 8mg 左旋咪唑至 10ml Tris（pH8.2）中；加 3.8mg 萘酚 ASMX 磷酸盐至 340μl DMF 中；混合。再加 10mg Fast Red TR 盐，摇晃直到溶解，过滤。

2. 免疫和组织制备

1）小鼠腹腔注射 50μg CGG，用含 10^9 个化学灭活的百日咳杆菌的明胶作为佐剂。

2）5 周后，通过腹腔注射 50μg 偶联有 NP 的可溶性 CGG（NP_{18}-CGG）。

3）处死小鼠前 2h，给小鼠注射 2mg BrdU，以标记取组织时细胞的增生。

4）用 BrdU 进行标记追踪实验时，标记起始时给小鼠注射 2mg BrdU，标记过程中在小鼠饮水中给予 1mg/ml BrdU 。

5）取脾脏，置于一块铝箔上，在液氮中速冻。用铝箔包裹后，脾脏可放在密封的塑料袋中置于－70℃，以备切片。

6）在恒冷切片机中用 OCT 复合物将冷冻的组织包埋。切割为 4 个 5μm 厚的纵切的切片，分别放在有 4 个点的玻片上。风扇下 1h 晾干，然后用分析级的丙酮 4℃固定 20min，风扇下风干 10min，放在密封的塑料袋中，存于－20℃，备用。

3. 抗原特异性 B 细胞和浆细胞的免疫组化染色

1）在风扇下融解放置于塑料袋中的载玻片。将载玻片置于含洗液的洗缸中，摇振 5min。

2）将载玻片置于湿盒里的水平托盘中。在载玻片上的每个组织切片加入 100μl 的第一抗体，孵育 45min。

3）在孵育期间，准备第二抗体：用含 10%正常小鼠血清的洗液稀释第二抗体，总体积为 100μl。

4）用洗液洗涤载玻片 2 次，加 100μl 二抗至载玻片上的每个切片上，湿盒中孵育 30min。在孵育期间，准备 StreptABComplex/AP。

5）用洗液洗涤载玻片 2 次，在每个切片上加 100μl StreptABComplex/AP，湿盒中孵育 30min。

6）用洗液洗涤载玻片 2 次。准备 DAB 底物：将 1 片 DAB 加至 15ml 洗液中，过滤。加 1 滴 H_2O_2 至 10ml DAB 底物中。

7）加 2 或 3 滴 DAB 底物至每个切片上，显色约 5min。

8）用洗液洗涤载玻片 2 次。准备 AP 底物。

9）加 2 或 3 滴 Fast Blue 底物至每个切片上，显色约 20min。载玻片如果不进行显微操作或 BrdU 染色，可以用封固剂（ImmuMount）包埋，用盖玻片封片。

10）将载玻片留在装有洗液的、置于冰上的槽内，以备显微操作用。

4. 组织切片中 BrdU 的免疫酶染色

1）用洗液洗涤组织切片 5min，然后用蒸馏水洗 3 次。

2）60℃，1mol/L HCl 中孵育切片 25min，使 DNA 变性，BrdU 更易渗入，同时水解组织切片上的所有 Ig。

3）在玻璃槽中用蒸馏水冲洗切片 3 次，每次 5min，再用洗液洗 1 次。

4）加 100μl 鼠的抗 BrdU，在湿盒中孵育 1h。用洗液洗涤 2 次。

5）加 100μl 生物素化的山羊抗鼠抗体，湿盒中孵育 45min。在孵育期间，准备

StreptABComplex/AP。

6）用洗液洗涤载玻片 2 次。加 100μl StreptABComplex/AP，湿盒中孵育 30min。

7）用洗液洗涤 2 次。在洗涤时，准备 AP 底物 Fast Red。

8）加 2 或 3 滴至每个切片上，显色约 20min。封片。

5. 生发中心和浆细胞的显微操作

NP 结合细胞和 IgD 双染色（用来鉴别滤泡区）的切片在明视野显微镜下进行显微操作。用染有 CD3 和 IgD 的邻近切片来确定滤泡、生发中心和 T 细胞区的位置。

1）用针器拉制显微操作用的针。准备含 25μl 裂解液的 200μl PCR 管。

2）用针去除单个细胞周围的组织，再用新的针刮取单个细胞。

3）针头折断至含裂解液的 200μl PCR 管中（包括阴性对照），37℃孵育过夜或者 56℃孵育 2h。

4）加热至 95℃ 10min，热灭活蛋白酶 K。

6. 通过 PCR 的方法扩增 V 区基因

已获得的细胞裂解物进行两轮的 PCR 反应。第一次正向引物 Ke13 与基因组 DNA 5′端 V186.2 的转录起始位点互补，而第一次反向引物 Ke14 与 J_H2 和 J_H3 之间的区域互补。5′端固有引物 Ke12 与 V186.2 基因节段的最初 20 个核苷酸互补，此外，还含有限制性内切核酸酶 *Xba* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ和识别序列。3′端的固有引物能与 J_H2 基因节段结合，并含有 *Bam*H Ⅰ 的识别序列。表 5-8 中列出了引物的组合（Jacob and Kelsoe，1992），可以用来扩增 NP 特异性细胞中 V_H 基因和所有的 J_H 节段。

表 5-8 PCR 所用引物

引物名称	序列（5′→3′）	退火位点	备注
Ke13	CCTGACCCAGATGTCCCTT CTTCTCCAGCAGG	V186.2 引导部分	
Ke14	GGGTCTAGAGGTGTCCCTA GTCCTTCATGACC	J_H2 和 J_H3 之间	
Ke12	TCTAGAATTCAGGTCCAAC TGCAGCAGCC	V186.2 起始部分	
Ke17	ACGGATCCTGTGAGAGTGG TGCCT	J_H2 区内	
fi3	CCTGACCCAGATGTCCCTT CTTCTCCAGC	V186.2 引导部分	比 Ke13 少 3 个碱基
fi4	CTCACCTGAGGAGACAGTG ACCGTGGTCCCT	$J_H1.2.3.4$	结合所有 4 个 J_H 节段
fi2	GTGTCCACTCCGAGGTCCA ACTGCAGCAG	V186.2 同系物起始部分	结合 V186.2 和其同系物（比 Ke12 少 2 个碱基）
fi7	AGGAGACAGTGACCGTGGT CCCTTGGCCCCA	$J_H1.2.3.4$	结合所有 4 个 J_H 节段

1）准备 25μl PCR 缓冲液：9.5μl 水，5μl 10×Pfu 缓冲液，1μl 0.5%明胶，1μl

20mmol/L dNTP，2.5μl $MgCl_2$（10mmol/L），4μl 正向引物（5μmol/L），4μl 反向引物（5μmol/L），0.5μl Pfu Turbo DNA 聚合酶。

2）用多通道的移液器加 25μl PCR 缓冲液至消化液中（包括阴性对照）。

3）用石蜡油覆盖反应物。PCR 反应体系为：94℃2min 变性，然后 94℃30s，58℃30s，72℃1min，共 40 个循环，最后 72℃7min。

4）小心打开管子以避免交叉污染。用多通道移液器从第一次 PCR 产物中转移 2μl 至一个新的 96 孔 PCR 板中（包括阴性对照）。

5）准备 48μl PCR 缓冲液：30μl 水，5μl 10×缓冲液，1μl 0.5%明胶，1μl 20mmol/L dNTP，2.5μl $MgCl_2$（10mmol/L），4μl 内正向引物（5μmol/L），4μl 内反向引物（5μmol/L），0.5μl Pfu Turbo DNA 聚合酶。

6）每管中再加入 48μl 的 PCR 缓冲液，共 50μl 体系。加 2 滴石蜡油，用与第一次 PCR 同样的程序扩增。

7）加 10μl loading buffer 至 50μl PCR 产物中，1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分析，在紫外灯的照射下，将含特异性的 PCR 产物条带的凝胶用小刀切割放入干净的微量离心管中。

8）用 MinElute extraction kit（Qiagen）进行 DNA 的纯化。如果 PCR 产物来自单个细胞，那么纯化后干的 PCR 产物可以和第二次 PCR 的其中一个引物一起进行 DNA 测序。

9）如果 PCR 产生自许多细胞（如整个生发中心），在测序之前，产物首先要进行克隆。Pfu DNA 聚合酶产生的是平端，因此可用平端克隆载体，如 ZERO Blunt TOPO PCR cloning kit 进行测序。克隆进细菌的 PCR 产物可用 QIAprep Miniprep kit（Qiagen）纯化后测序。

7. DNA 测序和序列分析

1）可通过测序反应来检测突变。突变可用相反方向的第二次测序反应来确定。

2）序列可以被校准，突变可用公开的基于网页的工具如 ClustalW（http://www.ebi.ac.uk/clustalw/）进行鉴别。

3）序列在免疫遗传学数据库（http://imgt.cines.fr/）中通过 IgBLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/）或 IMGT/V-QUEST 与生发中心序列进行比较。

注意事项

1）BrdU 是诱变剂，因此，BrdU 标记的组织不能用来进行免疫球蛋白基因突变的研究。同样的原因，操作时应小心。

2）除了选择传统的玻璃针作为显微操作器以外，也可以选 Leica and Palm（Bernried，Germany）的显微解剖刀，这种显微解剖刀可以通过激光从染色后或干的切片中切割非常小的组织样品。

3）从脾脏中去除脂肪组织。当切割冷冻的切片时，脂肪组织会给切割带来难度。

4）将脾脏放进标记好的小块铝箔中，通过反复浸入液氮中冷冻。

5）将一小条 OCT 复合物放在冷冻切割块上，将脾脏放在上面。用冷冻喷雾器迅

速冷冻。修剪脾脏使其在一个水平面上含有白髓和红髓。用手术刀去除在脾脏周围的 OCT 复合物。

6）洗涤载玻片时去除多余的液体：用纸巾从载玻片的一侧吸去多余液体。从洗液中取出载玻片后，用一小块折叠好的滤纸轻轻吸去组织切片之间多余的液体。

7）在进行多色染色前先确定抗体的最佳稀释度。对抗体进行连续稀释，包括一个缓冲液的空白对照，在邻近的切片中确定一个稀释度：最大的特异性染色，最小的背景染色。

8）在明亮的显微镜下会发生染料的沉积。因此，显影后的切片如果不立即在显微镜下观察，应置于暗盒中。

9）显微操作的对象最好是新鲜染色的切片。如果不立即操作的话，可放在冰上几小时。

10）在组织切片酸变性后，加鼠的抗 BrdU 前，切片可在洗液中 4℃过夜。

11）污染是 PCR 的主要问题。因此必须做几个阴性对照：在裂解步骤中含干净针的管子；TE 缓冲液而不是裂解液，加至第一次 PCR 中；第二次 PCR 时不加产物。

12）Ke12、3、4 和 7 可以用来扩增 V186.2 和与 Jh2 重组的相关的 V 区基因，Jh2 是针对 NP 特异性的初次免疫应答的标准节段。Fi2、3、4 和 7 是这些引物的变异，可以结合广泛的 V 基因库和所有的 Jh 节段。这些可用作研究 T 细胞非依赖性或针对 NP 的次级免疫应答。

13）在扩增 DNA 的单分子时，要小心操作以防 PCR 污染。准备组织切片、显微操作和建立第一次 PCR 时要在同一房间的不同位置进行。PCR 仪要放在另一间房间。分析和制备已扩增的 PCR 产物要在第三个地方进行。每个实验室有自己的一套仪器和耗材。一次性的塑料制品购买无菌的，不需要高压。用带刻度的无菌的过滤头。工作台表面用 DNAZap（Ambion，Austin，TX）清洁。

14）商品化的测序服务可测大约 350bp 的 DNA 序列。因此通常情况下，用一个引物一个方向的单向测序对检测点突变足够了。可通过第二次 PCR 引物反方向的测序确定突变。测序反应只能从测序引物 3′端后的 10～20bp 开始读起，如果只用单向测序的话，有一部分序列就不能被检测到。

15）在测序前克隆 PCR 产物还有另外的好处：在克隆载体中的引物也能被用来测序，这样会产生 PCR 产物的全长序列。

16）如果只是从单个细胞中进行 PCR，在最初几个 PCR 循环中发生突变将会影响 DNA 测序。如果突变发生在后来的循环中，那么只会在少部分 PCR 产物中出现，不会影响 DNA 测序。

17）鼠免疫球蛋白可变区基因并没有被完全测序。因此，测得的序列与目前的 Ig 数据库中生发中心序列不匹配并不代表其一定是突变序列。

五、B 淋巴细胞的信号转导

B 细胞抗原受体（BCR）的信号转导可调节 B 细胞的发育、存活和克隆增生。BCR

包含膜结合型的免疫球蛋白（mIg）和二硫键连接的Ig-α/Ig-β异二聚体。抗原介导的BCR交联使多重信号蛋白的酪氨酸磷酸化，诱导钙动员和下游丝氨酸/苏氨酸及转录因子的活化。在B细胞的发育过程中，BCR能以抗原依赖或非依赖的方式产生信号。在体外用抗Ig抗体刺激来模拟抗原刺激研究抗原依赖性的信号模式。在用磷酸酶抑制剂pervanadate（PV）处理J558L细胞研究蛋白质酪氨酸激酶（PTK）底物磷酸化的过程中，发现了抗原非依赖性的、BCR表达依赖性的信号模式（Reth，2002）。转基因小鼠和基因敲除小鼠的研究也证实了确实存在抗原非依赖性的信号模式（Lam and Kuhn，1997）。因此，可以在体外用PV刺激B细胞抑制蛋白质酪氨酸磷酸酶（PTP），改变胞内激酶和磷酸酶的平衡，研究抗原非依赖性的信号模式。

邻近的BCR信号单元有PTK Syk和Lyn、接头蛋白SLP-65（aka BLNK或BASH）和一种蛋白质酪氨酸磷酸酶（PTP），最有可能的是SHP-1。Syk磷酸化ITAM两端的酪氨酸残基，而Lyn只能磷酸化酪氨酸的N端。Syk可通过其两个N端的SH2区域结合磷酸化的ITAM酪氨酸从而被活化。这一BCR/ITAM依赖的Syk活化和信号放大可被PTP所抵消。

Syk一个重要的效应物是接头蛋白SLP-65，SLP-65在BCR衔接后能被Syk迅速磷酸化，在BCR介导的磷脂酶C（PLC-γ2）的活化中起着关键的作用。活化的PLC-γ2产生第二信使二酰甘油（DAG）和三磷酸肌醇（IP_3）。IP_3与同源受体结合后从内质网中释放Ca^{2+}至胞质。并且，DAG活化多重蛋白激酶C（PKC）亚型和作用于小GTP酶Ras和Rap的鸟嘌呤核苷酸交换因子（guanine nucleotide exchange factor，GEF）。Ras的活化型（Ras-GTP）通过B-Raf和Raf-1激酶介导ERK通路的活化。另外，它和跨膜蛋白CD19或船坞蛋白BCAP一起促进磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）的活化。PI3K是B细胞中必需的信号元件，可产生PIP_3。PIP_3作为许多具有PH域蛋白（如Btk或PLC-γ2）的配体，可招募Btk或PLC-γ2至细胞膜。同样，PIP3水平的升高导致PH域依赖的蛋白质激酶B（PKB，也称为Akt）被招募至细胞膜，可被磷酸肌醇依赖的激酶1磷酸化和活化。最后，升高的PIP3和酪氨酸磷酸化的CD19和SLP-65一起招募Vav至细胞膜。Rac-GTP将BCR和ERK、JNK和P38连接起来，诱导早期快反应基因。

BCR触发的另一重要事件是转录因子c-Rel/NF-κB的活化。c-Rel/NF-κB调节存活因子如Bcl-XL和c-IAP的表达。在不受刺激的B细胞中，胞质中的NF-κB被其抑制蛋白IκB所抑制。BCR介导的NF-κB活化包括了以下几个事件。例如，Btk、PLCγ-2和PKC通过IκB激酶（IKK）复合物使IκB发生快速的磷酸化。这一磷酸化使得IκB通过泛素/蛋白酶体途径所降解，发生NF-κB的释放和核转录。

信号蛋白的磷酸化鉴定通常是将待测信号蛋白进行SDS-PAGE、Western印迹，利用特异性磷酸化抗体来分析其磷酸化状态。有时需要先将待测蛋白质纯化，可以直接利用针对待测蛋白质的特异性抗体达到纯化待测蛋白质的目的（免疫共沉淀方法）。免疫共沉淀主要是利用抗原和抗体能特异性结合以及细菌蛋白质的“prorein A/G”能特异性地结合到抗体的Fc片段进行的。将prorein A/G预先结合固化在argarose的bead上，使之与含有待测蛋白质的全细胞裂解液（total cellular lysate，TCL）及特异性抗

体反应后，bead 上的 prorein A/G 就能吸附待测蛋白质达到纯化的目的。

此外，可以利用 GST pull-down 实验体外检测蛋白质与蛋白质的相互作用。利用重组技术将探针蛋白与谷胱甘肽巯基转移酶（glutathione S transferase，GST）融合，融合蛋白通过 GST 与固相化在载体上的谷胱甘肽亲和结合。因此，当与融合蛋白有相互作用的蛋白质通过层析柱时可被吸附，从而达到分离的目的。在所有蛋白质-蛋白质相互作用区域中，SH2 和 SH3 研究得最为深入。它们可分别与磷酸化的酪氨酸残基和脯氨酸富集区相结合。为了得到与给定区域特异性结合的配偶体的信息，可分别将它们的 cDNA 与 GST 的 cDNA 融合。合成的 GST-信号区域嵌合体可在细菌里表达，通过裂解细菌进行纯化。这些 GST 融合蛋白可以用来沉淀来自不同刺激细胞的结合配偶体。因此，TCL 可与适量的含有待测信号区域的 GST 融合蛋白孵育。由于给定的 SH2 或 SH3 区域只能结合有限数量（酪氨酸磷酸化的）的蛋白质，用 GST 融合蛋白进行 pull-down 实验，只有酪氨酸磷酸化蛋白中的一些指定亚型能被显影。

许多磷酸化事件常常与酶活性紧密联系在一起，因此，测定一个蛋白质在某一氨基酸残基上的磷酸化状态常被用来判断酶的活性。磷酸特异性抗体通常用来检测总的细胞裂解物中某一特定酶的活性。

BCR 交联导致几条信号转导通路同时发生活化，这些信号通路通常在下游事件中会聚，如装配为活化的转录因子复合物。通过一系列低分子质量酶抑制剂，有可能分析出在这些复杂事件中每条信号转导通路的作用。

抗原或凝集素等丝裂原作用于 B 淋巴细胞，经 IP_3 途径使胞内钙库释放和胞外钙离子内流，使细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增高。因而淋巴细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 改变可间接反映细胞活化水平及其免疫反应强度。钙荧光指示剂法是目前应用最广泛的，也是较好的测定胞内 Ca^{2+} 浓度的方法。荧光指示剂对 Ca^{2+} 有高度选择性和高亲和力，能够检测低浓度的 Ca^{2+}，并且应答迅速。常用的荧光探针有 quin-2/Am、Fura-2/Am 及 Indo-1 等。Indo-1是典型的双发射荧光探针（June and Rabinovitch，1990），较为敏感，无毒，并且很容易被活细胞所吸收并且均匀分布于胞质中。未结合钙时，在 485nm 左右有发射峰，结合钙后，则在 405nm 处有发射峰，两者的比值与细胞内游离钙离子浓度呈线性关系，将此比值与标准曲线相比即可得出细胞内游离钙浓度。B 细胞系，如 DT40 或 K46，以及人和鼠的原代 B 细胞均可用此种方法检测。

综上所述，本节着重介绍如何分析抗原依赖和非依赖的酪氨酸磷酸化事件，应用磷酸特异性抗体和低分子质量酶抑制剂研究 BCR 激活的信号通路和信号蛋白的活化状态，以及从不同活化的 B 细胞中研究钙动员的方法。

材料与试剂

细胞刺激用抗 Ig 抗体，如鼠抗鸡 IgM M4（Southern Biotechnologies）或山羊抗鼠 κ（Southern Biotechnologies）

原钒酸钠（Na_3VO_4，Sigma）

H_2O_2

Protein G Sepharose beads（Amersham Pharmacia）

Glutathione-Sepharose beads（Amersham Pharmacia）
DT40 细胞
MEK 抑制剂 U0126
PI_3K 抑制剂 LY294002
饥饿培养基
Indo-1（Molecular Probes）

（一）用抗 Ig 抗体刺激 B 细胞研究抗原依赖性的信号转导模式

步骤

1）收集 B 细胞，用预冷的 RPMI-1640 培养基调整细胞密度为 10^7 个/ml。刺激前都应该将细胞置于冰上。
2）将细胞悬液预温至 37℃。加抗 Ig 抗体孵育。
3）孵育后，在台式离心机上离心 10s，然后用预冷的 200μl 裂解液重悬细胞。细胞裂解物置于冰上 30min，然后通过离心的方法去除碎片（4℃下 11 600*g* 离心 10min）。
4）上清进行蛋白质定量，调整各个样品的浓度，使每个样品的上样量保持一致。
5）用等体积的 2×上样缓冲液混合，煮沸 5min 使蛋白质变性，然后置于冰上。
6）蛋白质提取物用 SDS-PAGE 分离，转移至 PVDF 膜上，Western 印迹分析蛋白质的磷酸化状态。

（二）用磷酸酶抑制剂 PV 刺激 B 细胞研究抗原非依赖性的信号转导模式

步骤

1）将 1ml 10mmol/L Na_3VO_4 贮存液和 330μl 的 30% H_2O_2 混合，室温孵育 5min。当溶液出现黄色时表明已成功形成 PV 复合物。
2）将该溶液用水进一步进行 1∶5 的稀释，取 5μl 加至 10^7 个细胞中（用 1ml RPMI-1640 培养基悬浮细胞），终浓度为 25μmol/L PV。
3）随后离心 10s 沉淀细胞，然后用预冷的 200μl 细胞裂解液重悬细胞。细胞裂解物置于冰上 30min，然后通过离心的方法去除碎片（4℃下 11 600*g* 离心 10min）。
4）上清用等体积的 2×上样缓冲液混合，煮沸 5min 使蛋白质变性，然后置于冰上。
5）蛋白质提取物用 SDS-PAGE 分离，转移至 PVDF 膜上，Western 印迹分析蛋白质的磷酸化状态。

（三）免疫沉淀

步骤

1）将 1×10^7～2×10^7 个细胞用合适的裂解液裂解。TCL 用 protein G Sepharose beads 预清除，4℃旋转 1h。
2）将已预清除的 TCL 与 0.5～5μg 抗体孵育，置于冰上 1h。

3）加与预清除步骤中等量的 protein G Sepharose beads，置于转轮中，4℃旋转过夜。

4）用 1ml 裂解液洗 3 次以上。用 50μl 裂解液重悬 beads，与 50μl 2×上样缓冲液混合，煮沸 5min（用作 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析蛋白质的磷酸化状态）。

（四）通过 GST 融合蛋白纯化蛋白质

步骤

1. 转化感受态大肠杆菌

1）在冰上融化 50μl 感受态细菌（如 DH10B 或 DH5α）。与 100ng 编码 GST 融合蛋白的表达载体混合（如 pGEX-2T-Shc-SH2），置于冰上 30min。

2）42℃热激 2min，加入 1ml LB 培养液，37℃孵育 30min。

3）将细菌涂在含 100μg/ml 氨苄青霉素的选择性 LB 琼脂板上，37℃孵育过夜。

2. 制备 GST 融合蛋白

第一天（中午）

1）将一个克隆或从冷冻的培养基中穿刺接种至 200ml LB/amp（50μg/ml）培养基中。

2）置于 37℃摇动器，孵育过夜。

第二天

1）加 20ml 过夜培养物至 230ml LB/amp 中，生长至 OD_{600} 为 0.8～1.0（大约 2h）。

2）加 IPTG 到终浓度为 100μmol/L，37℃孵育 3～4h 或室温过夜。

3）沉淀细菌（4℃下 2500*g* 离心 15min），弃去上清，将沉淀冻于－20℃。

第三天

1）冰上溶化沉淀，重悬于 10ml 预冷的裂解液中。冰上裂解 30min，不时混合一下。

2）冰上超声裂解（20bursts/10s），使培养温度维持在 10℃以下（4℃下 11 600*g* 离心 30min。

3）可选步骤：－80℃冷冻含 GST 融合蛋白的裂解物，备用（一些特殊的 GST 融合蛋白一旦纯化后就非常不稳定）。

4）用洗液洗 GS beads 3 次。用 500μl 洗好的 GS beads 与裂解物共孵育，4℃放在振动器上 3h。

5）收集上清，进行 SDS-PAGE 分析。

6）用 10ml 洗液清洗 GS beads 3 次。将 5μl GS beads 纯化的 GST 融合蛋白和标准的 BSA 样品通过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色，比较后推算出纯化的蛋白质产量。

3. 用 GST 融合蛋白沉淀

1）1×10^7～2×10^7 个 B 细胞按上述方法裂解。TCL 用 10μl GS beads 预清除，4℃旋转 1h。

2）将已预清除的 TCL 与 2～10μg 结合有 GS beads 的 GST 融合蛋白孵育，置于转轮中，4℃旋转过夜。

3）用1ml裂解液洗3次以上。用50μl裂解液重悬beads，与50μl 2×上样缓冲液混合，煮沸5min，用作SDS-PAGE和Western印迹。

（五）低分子质量的酶抑制剂作为功能性分析胞内信号转导的工具

本节介绍了在DT40细胞中分别用U0126和LY294002完全抑制Raf/MEK/ERK和PI3K/PKB通路的方法。

步骤

1）调整DT40细胞的密度为10^7个/ml。加MEK抑制剂U0126或PI3K抑制剂LY294002至细胞悬液中，使其终浓度分别为50μmol/L或10μmol/L。另外，设DMSO对照组。

2）37℃孵育20～30min。用5μg抗IgM M4抗体刺激细胞。

3）离心10s，用200μl预冷的裂解液重悬细胞。置于冰上30min，离心去除细胞碎片（4℃下11 600g离心10min）。

4）上清用等体积的2×上样缓冲液混合，煮沸5min使蛋白质变性，然后置于冰上。

5）随后，7.5×10^5～1×10^6个细胞量的蛋白质提取物用SDS-PAGE分离，转移至PVDF膜上，通过Western印迹分析活化的磷酸化ERK和PKB，证实对Raf/MEK/ERK和PI3K/PKB的抑制。

（六）流式分析BCR介导的Ca^{2+}动员

步骤

1）用饥饿培养基调整细胞密度为1×10^7个/ml。1ml细胞中加入15μl loading solution，37℃孵育45min。

2）用10ml预冷的饥饿培养基洗涤细胞，用3.3ml饥饿培养基重悬，置于冰上，在分析前避光保存。

3）用2ml饥饿培养基（预温至37℃）稀释细胞悬液。

4）indo-1负载细胞在加指定的刺激剂之前先测50s，记录$[Ca^{2+}]_i$基线。

5）$[Ca^{2+}]_i$的变化可用405nm/525nm的密度点与时间比来估算。为了更好地说明$[Ca^{2+}]_i$的变化，CellQuest所得的原始数据可用FCSassistant转变为标准曲线。

注意事项

1）可根据实验需要，选择原代B细胞或不同的B细胞系研究抗原依赖或非依赖性BCR信号转导。常用的B细胞系有DT40、WEHI-231、K46、J558L、Ramos。

2）除非用转基因小鼠模型或确定独特型的细胞系（如J558L转染子），大多数B细胞系和从淋巴器官分离的B细胞都必须用抗Ig抗体刺激来模拟抗原刺激。

3）不同的细胞系有效刺激所需的抗Ig抗体的最佳量是不同的，每个抗体都必须通过实验来确定。一般说来，2～10μg的刺激抗体通常足够在鼠脾脏B细胞和B细胞系DT40、K46或Ramos触发多重信号通路。鸡DT40 B细胞可用单克隆

抗 IgM 抗体 M4 刺激。同样，Ramos B 细胞能用山羊抗人 IgM F（ab′）$_2$ 段或山羊抗人 IgM 抗体刺激。K46 细胞可用山羊抗鼠 IgG 抗体刺激。此外，K46、WEHI-231 和大多数初始的鼠 B 细胞可用山羊抗 κ 抗体刺激。

4）细胞用含有去污剂，如 Triton X-100、NP40 或洋地黄皂甙的裂解液重悬。根据实验的目的和所测蛋白质的特性选择去污剂。例如，一些特异的蛋白质-蛋白质相互作用只能通过免疫共沉淀来检测，就要用温和的裂解条件，因此，可选择低浓度的去污剂（如 0.5% NP40）或特殊的去污剂，如洋地黄皂甙。相反，如要检测溶胞产物里免疫复合物中蛋白质激酶的活性，不要选择温和的去污剂，建议选择 RIPA 缓冲液。温和的去污剂不能溶解膜蛋白和细胞骨架或核蛋白。溶解膜蛋白和核蛋白（如早期快反应基因产物 Egr-1 或 c-Fos）最好选用 NP40、去氧胆酸钠和 SDS 的混合物（RIPA 缓冲液）。

5）PV 不稳定，为了取得可重复的结果，PV 必须在实验前立即配制。而 10mmol/L Na_3VO_4 和 30% H_2O_2 贮存液可 4℃保存。不同的细胞系对于 PV 的敏感度是不一样的，因此，建议进行预实验确定最佳的 PV 剂量和孵育时间。

6）TCL 与适量的抗体孵育，所需的抗体量可凭经验确定。一般说来，0.5～5μg 的单克隆抗体或亲和力纯化的抗血清足够分离待测蛋白质。

7）TCL 与 GST 融合蛋白孵育时，一般说来，1×10^7～2×10^7 个细胞裂解物所需的 GST 融合蛋白量为 2～10μg。

8）制备 GST 融合蛋白时，本方法是按 250ml 的 LB 培养物量设计的，大约可获得 500μg 的 GST 融合蛋白。如果想获得更多的融合蛋白，请多批操作。

9）Ca^{2+} 动员是一个能量依赖和温度敏感的过程，因此，在记录的时候细胞悬液的温度要保持在 37℃。

六、从 B 淋巴细胞中分离脂筏

脂筏是脂质双层内含有特殊脂质的蛋白质的微区，富含胆固醇和鞘磷脂。与糖基磷脂酰肌醇（GPI）相连，或被肉豆蔻酸酰化，是脂筏分子主要的两种蛋白质修饰形式。B 淋巴细胞中，脂筏在启动 BCR 信号中发挥关键的作用，对其功能的研究，首先要对其进行分离和鉴定。脂筏具有不溶于非离子去污剂的特点，因此，又称为去污剂不溶性富含糖脂复合体（DIG）。利用这一特点，可以用非离子去污剂，如 TritonX-100 分离脂筏。在低温下，以非离子型去污剂抽提细胞裂解物时，脂筏结构及其成分因具有抵抗去污剂溶解的能力，而在溶液中聚集形成不溶性复合物。由于其密度较低，可利用蔗糖密度梯度离心法将脂筏组分离心收集（Cheng et al.，1999）。然后以脂筏中富含的神经节苷脂 GM1 作为标志分子，利用荧光或生物素标记的霍乱毒素 2B 亚基进行亲和标记来鉴定脂筏。用该方法分离的脂筏纯度相对高，其生物学特性破坏较少。脂筏的溶解度受很多因素的影响，包括去污剂的选择、实验操作时的温度，以及脂筏所在的细胞。

用去污剂分离脂筏也会有一系列的假象，包括在活细胞中诱导形成膜结构的可能性。因此，在完整和（或）活细胞中也会发生明显的脂筏检测错误。可用化学交联和荧光共振能量转移（FRET）技术检测膜上接近的两种蛋白质，光电子显微镜来衡量局部扩散的单

独膜蛋白，单荧光示踪显微镜监测细胞膜上个别蛋白质和脂质的动力学。然而，这些技术虽然先进，但需要昂贵的仪器。

材料与试剂

处于对数生长期或对数生长后期的 CH27 小鼠 B 淋巴瘤细胞，85%或更高的活力

10% Triton X-100

1000×CLAP 蛋白酶抑制剂

100×磷酸酶抑制剂

亲和力纯化的山羊抗鼠 IgM+IgG $F(ab)_2$(Jackson ImmunoResearch，West Grove，PA)

甲基-β-环糊精（MβCD）

结合有 HRP 的霍乱毒素 B 亚单位（CTB）

特异性抗 CD45R 大鼠抗体、抗 Lyn 兔抗体、抗大鼠 Ig 和兔 Ig 的 HRP-偶联山羊抗体

步骤

1. 准备细胞

1）取 1×10^8 个 CH27 细胞到 50ml 圆锥形的离心管中（4℃下 458*g* 离心 5min）。

2）弃上清，细胞团块用冷 PBS 洗 3 次（4℃下 458*g* 离心 5min）。

3）用 1ml 冷的 1% BSA/PBS 重悬，转移到 15ml 锥形管，用于体外激活。如果实验设计不需要体外激活，则去除所有上清后，直接进行步骤 3)。

2. 诱导 BCR 交联形成脂筏

1）1×10^8 个细胞用 1ml 含有 15μg/ml 亲和力纯化的山羊抗鼠 IgM＋IgG 的 F $(ab')_2$的 1% BSA/PBS 重悬。置于冰上在摇床孵育 30min。

2）加 10ml 冷的 1% BSA/PBS 中止活化反应。

3）洗细胞 2 次（4℃下 458*g* 离心 5min），最后一次洗涤时应注意小心地将所有上清全部去除。

4）用 1% BSA/PBS 重悬细胞。

3. 裂解产物的匀浆化

1）以 1∶10 的比例用 1×TNE 稀释 10% Triton X-100，制备新鲜裂解液 。

2）CLAP 以 1∶1000 的比例加到裂解液中，磷酸酶抑制剂以 1∶100 的比例加到裂解液中。需要注意的是，细胞和细胞裂解液都必须是冷的，后面所有的程序都要在冰上进行。即使样品温度短暂升高也可能会导致脂筏溶解。

3）细胞团块（约 1×10^8 个/样本）用 1ml 冰冷的裂解液重悬，用移液器上下吹打混匀。对照组加入 2mmol/L 甲基-β 环糊精（MβCD），它能破坏胆固醇和磷脂，从而破坏脂筏，但对细胞膜的完整性无影响。

4）样品于冰上孵育 30～45min。匀浆器轻轻打碎细胞 20 次。

4. 不连续的蔗糖梯度

1）细胞裂解物与 85%蔗糖按 1∶1 混合。溶液非常黏稠，用移液器上下吹打混合彻底，同时注意避免气泡。完全混合在这一步是绝对必要的。

2）用 1×TNE 新鲜配制 35%和 5%的蔗糖溶液，分别在 35%和 5%的蔗糖溶液中加入磷酸酶抑制剂，最终浓度为 1∶100。

3）始终将样品管置于冰上，先用 6ml 35%蔗糖，后用 3.5ml 5%的蔗糖一滴一滴地覆盖在已稀释的裂解物中。必须注意慢慢地添加蔗糖溶液，以免扰乱不连续梯度的形成。

5. 超速离心，收集成分

1）将平衡好的样品管小心地放进预冷的超速离心机中，避免任何的摇动。

2）样品进行离心（4℃下 200 000*g* 离心 16～20h）。离心结束后，用镊子轻轻地将离心管取出，并立即放在冰上。

3）使用 1ml 自动移液器从上到下依次收集样品 12 份（1～12），每份样品约 1ml。留待鉴定脂筏及进行脂类组分分析。样品可冻于－20℃，长期存储若干个月至一年，以后分析。也可置于 4℃短期贮存（1 周）。

6. 鉴定脂筏

为了验证脂筏已经被分离，需要分析从蔗糖密度梯度中获得的样品是否为脂筏的组分：Src 家族激酶 Lyn、鞘糖脂 GM1，以及非脂筏组分 CD45。蔗糖梯度组分分析用 SDS-PAGE和蛋白质印迹，用 Lyn 特异性抗体检测 Lyn，用霍乱毒素 B 亚单位检测 GM1，用 CD45 特异性抗体检测 CD45。

注意事项

1）除了 CH27 细胞外，本方法同样适用于分离鼠（A20，WEHI）、人（Ramos，BJAB，Daudi）和鸡（DT40）细胞系，鼠脾脏来源的 B 细胞以及人的外周血 B 细胞。

2）分离脂筏的最小细胞量是 10×10^6 个，溶于 0.2ml 去污剂，用 6ml 的蔗糖梯度。最大细胞量是 200×10^6 个，溶于 1ml 去污剂，用 12ml 的蔗糖梯度。应根据需要溶解的细胞量调整去污剂的浓度。一般原代细胞推荐用双倍的细胞量，因为原代细胞的大小明显要小一点。

3）除了 4℃保存的 1% Triton X-100 外，也可以使用 4℃保存的更低浓度的 Triton X-100（0.25%）分离 B 细胞的脂筏。此外，也可用几个不同的非离子型去污剂在 4℃下分离免疫细胞的脂筏，包括 1% Tween20、1% Brij-58、1% Brij-98、0.5% Brij-96、0.5% Lubrol、1% CHAPS 和 1% NP40。有效分离不同细胞类型的脂筏所需要的去污剂的种类和浓度可能都需要实验确定。

4）如选择 6ml 蔗糖梯度，细胞沉淀应溶解在 0.5ml 含有裂解液的 1% Triton X-100 中。85%、35%和 5%的蔗糖溶液的体积也应减半。

5）除了蔗糖梯度，B 细胞的脂筏也能用 Nycodenz 梯度和 OptiPrep 梯度分离。

6）不是所有的人类 B 细胞系都含有可检测量的 GM1。也可以检测其他鞘脂类，包括 GM3 或异 G 蛋白亚基 Gαi。除了 CD45，转铁蛋白受体可以用来作为可溶性膜的标志。

附：试剂配制

饥饿培养基

RPMI-1640，2mmol/L L-谷氨酰胺，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素，10mmol/L HEPES，50μmol/L β-巯基乙醇，1% FCS；如果为 DT40 细胞，则再加 0.25% CS。

裂解液（用于 GST 融合蛋白制备）

50mmol/L Tris-HCl（pH7.5），150mmol/L NaCl，1% Triton X-100，10μg/ml 抑酞酶，2μg/ml 亮肽素，100μmol/L 苯甲磺酰氟（PMSF），1mg/ml 溶菌酶，5mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）。

100×磷酸酶抑制剂

200mmol/L Na_3VO_4，1mol/L NaF 溶于 DMSO，每管 200μl 分装后存放于－20℃。一旦解冻后，存放于 4℃。

洗液（用于 GST 融合蛋白制备）

50mmol/L Tris-HCl（pH7.5），150mmol/L NaCl，0.1% Triton X-100，10μg/ml 抑酞酶，2μg/ml 亮肽素，100μmol/L PMSF。

85%（质量体积比）的蔗糖溶液

溶于 1×TNE 缓冲液的超纯蔗糖贮存液。制备贮存液需要加热蔗糖。为了避免焦化，蔗糖在水浴中间接加热。每管 15ml 分装后存放于－20℃。一旦解冻，可以再次冻结。

35%和 5%（质量体积比）的蔗糖贮存液

从新鲜的 85%的蔗糖用 1×TNE 缓冲液配制。

1000×CLAP 蛋白酶抑制剂

糜酶抑素，亮肽素，抗痛素和抑胃肽 A 各 2.5mg/ml 溶于二甲基亚砜（DMSO 溶液），每管 20μl 分装后存放于－20℃。一旦解冻后，存放于 4℃。

NP40/RIPA 缓冲液

50mmol/L Tris-HCl（pH7.4），1% NP40，0.5% 脱氧胆酸钠，0.1% SDS，137.5mmol/L NaCl，1% 甘油，1mmol/L 原钒酸钠，0.5mmol/L EDTA（pH8.0），加蛋白酶抑制剂（0.1mg/mmol/L 抑酞酶，0.5mg/ml 亮肽素，1mmol/L AEBSF）。

RIPA 缓冲液

50mmol/L HEPES（pH 7.4），1% Triton X-100，0.5%脱氧胆酸钠，0.1%十二烷基硫酸钠（SDS），50mmol/L NaF，10mmol/L 原钒酸钠，5mmol/L EDTA，加蛋白酶抑制剂（0.1mg/ml 抑酞酶，0.5mg/ml 亮肽素，1mmol/L AEBSF）。

TNE

Tris-HCl，氯化钠，乙二胺四乙酸（EDTA）缓冲液（pH7.5）从 10×TNE 贮存液稀释：5ml 1mol/L Tris-HCl（pH 7.5），50ml 1.5mol/L NaCl，5ml 0.5mol/L EDTA 和 440ml ddH_2O，4℃保存。

（钱　程　钱　莉）

参考文献

Allen CD，Okada T，Cyster JG. 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. Immunity，27：190～202.

Allman D，Pillai S. 2008. Peripheral B cell subsets. Curr Opin Immunol，20：149～157.

Batista FD，Harwood NE. 2009. The who，how and where of antigen presentation to B cells. Nat Rev Immunol，9：15～27.

Bleesing JJ. 2004. Assays for B cell and germinal center development. Curr Protoc Immunol，Chapter 7，Unit.

Butler JE，ZhaoY，Sinkora M，et al. 2009. Immunoglobulins，antibody repertoire and B cell development. Dev Comp Immunol，33：321～333.

Chase MW. 1967. Preparation of immunogens. Methods in Immunology and Immunochemistry，1：197～209.

Cheng PC，Dykstra ML，Mitchell RN，et al. 1999. A role for lipid rafts in BCR signaling and antigen targeting. J Exp Med，190：1549～1560.

Hardy RR，Hayakawa K. 2001. B cell development pathways. Annu Rev Immunol，19：595～621.

Heyzer-Williams M，Heyzer-Williams L，Panus J，et al. 2003. Helper T-cell-regulated B-cell immunity. Microbes Infect，5：205～212.

Ho F，Lortan JE，MacLennan IC，et al. 1986. Distinct shortlived and long-lived antibody-producing cell populations. Eur J Immunol，16：1297～1301.

Houck DW，Loken MR. 1985. Simultaneous analysis of cell surface antigens，bromodeoxyuridine incorporation and DNA content. Cytometry，6：531～538.

Jacob J，Kelsoe G，Rajewsky K，et al. 1991. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. Nature，354：389～392.

Jacob J，Kelsoe G. 1992. *In situ* studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3- nitrophenyl) acetyl，II：a common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. J Exp Med，176：679～687.

Johnson GD. 1989. Immunofluorescence. In：Catty D. Antibodies. A Practical Approach. IRL Press. 2：179～200.

June CH，Rabinovitch PS. 1990. Flow cytometric measurement of intracellular ionized calcium in single cells with indo-1 and fluo-3. Methods Cell Biol，33：37～58.

Kawamoto H，Katsura Y. 2009. A new paradigm for hematopoietic cell lineages：revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. Trends Immunol，30：193～200.

Kuhn R，Rajewsky K，Muller W. 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. Science，254：707～710.

Lam K P，Kuhn R，Rajewsky K. 1997. *In vivo* ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. Cell，90：1073～1083.

LeBien TW，Tedder TF. 2008. B lymphocytes：how they develop and function. Blood，112：1570～1580.

Matteucci E，Giampietro O. 2008. Flow cytometry study of leukocyte function：analytical comparison of methods and their applicability to clinical research. Curr Med Chem，15：596～603.

Moir S，Fauci AS. 2009. B cells in HIV infection and disease. Nat Rev Immunol，9：235～245.

Mueller SN，Germain RN. 2009. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. Nat Rev Immunol，9：618～629.

Nakamura M，Kondo S，Sugai M，et al. 1996. High frequency class switching of an IgM^+ B lymphoma clone CH12F3 to IgA^+ cells. Int Immunol，8：193～201.

Okada T，Cyster JG. 2006. B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. Curr Opin Immunol，18：278～285.

Reth M. 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. Nat Immunol，3：1129～1134.

Sedgwick JD，Holt PG. 1983. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. J Immunol Methods，57：301～309.

Sedgwick JD，Holt PG. 1986. The ELISA-plaque assay for the detection and enumeration of antibody-secreting cells. J Immunol Methods，87：37～44.

Sze DMY，Toellner KM，Garc'a de Vinuesa C，et al. 2000. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. J Exp Med，192：813～821.

Tarlinton D，Radbruch A，Hiepe F，et al. 2008. Plasma cell differentiation and survival. Curr Opin Immunol，20：162～169.

Weill JC，Weller S，Reynaud CA. 2009. Human marginal zone B cells. Annu Rev Immunol，27：267～285.

第六章　抗原制备的原理及应用

抗原（antigen）是指可被 T、B 淋巴细胞等免疫细胞识别，并启动免疫应答的物质，包括蛋白质、糖脂类，以及其他化合物。抗原是诱导机体产生免疫应答的基本要素，机体免疫系统接受抗原的刺激，进而产生特异性的抗体和致敏淋巴细胞，称为免疫应答。完全抗原应同时具有免疫原性（immunogenicity）和抗原性（antigenicity）[或称为免疫反应性（immunoreactivity）]，免疫原性是指抗原能够刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞的能力；抗原性是指抗原具有能够与其所诱生的抗体或致敏淋巴细胞特异性结合的能力。仅具备免疫反应性（即抗原性）的物质称为半抗原（hapten），半抗原与蛋白质载体结合可以成为全抗原。大多数的蛋白质抗原如细菌、病毒的外壳蛋白等抗原为完全抗原，而一些多糖和某些药物的成分为半抗原。

抗原的制备研究是免疫学研究的重要领域，通过分离纯化技术、基因工程手段，以及多肽合成技术制备高纯度的抗原是疾病诊断、预防、治疗、抗体制备等研究的先决条件，本章主要介绍抗原分离纯化的原理、方法及应用。

第一节　天然抗原的制备原理及应用

天然抗原一般为大分子物质，广泛存在于自然界。从病原微生物中分离纯化抗原是感染性疾病诊断、预防和治疗的基础，获得高纯度的抗原可以用于诊断试剂盒的研制、疫苗的制备、疾病治疗靶点的研究，以及治疗性和诊断性抗体的制备。蛋白质、多肽和糖脂类是天然抗原的主要组分，从细菌或细胞中分离的生物大分子物质，必须进一步分离纯化才能获得可用于后续研究的抗原纯品。分离纯化抗原的方法很多，不同的抗原应选择合适的分离纯化方法，如粗提的细菌或细胞的裂解物质，在蛋白质中混杂着核酸或多糖，一般可用酶水解、有机溶剂抽提、选择性沉淀等方法处理；而对同类物质，如酶和杂蛋白，RNA 和 DNA，以及不同结构的蛋白质、酶、核酸之间的分离，情况则复杂得多，主要应用的方法有盐析法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法、吸附法、结晶法、电泳法、超速离心法、柱层析法等。其中盐析法、等电点法、结晶法多用于蛋白质的纯化；有机溶剂抽提多用于蛋白质和核酸的分离；另外柱层析法、梯度离心法广泛应用于蛋白质抗原的分离、纯化、鉴定、保存、应用。

抗原的制备过程复杂，所用的技术和方法较多。根据抗原的物理或化学特性不同，分离、纯化方法主要有两个方面，一是利用混合物中不同组分在不同物相中分配率的差别将这些组分分配到不同的物相中，如盐析、有机溶剂抽提、层析和结晶等；二是把不同组分的混合物置于单一物相中，通过物理力场的作用使各组分分配于不同的区域而达到分离的目的，如目前的电泳、离心、柱层析、超滤等。

抗原物质的制备方法，主要包括以下部分：①材料预处理；②细胞的破碎；③抗原的提取；④抗原的分离纯化；⑤抗原浓缩或干燥，保存。

一、抗原的粗提

（一）材料预处理

如果制备的抗原来源于动物和人体的组织如肿瘤组织等，一般需要进行预处理，包括剔除结缔组织、脂肪组织等，将组织块剪碎，酶解或者制备成单细胞悬液。若取材后不立即进行抗原的分离，一般应冷冻至深度低温冰箱或者液氮中保存。

（二）细胞的破碎

如果提取的抗原物质存在于体液、组织间液内，一般不需要进行细胞破碎，但其他如细胞膜抗原、胞内可溶性抗原等均需要进行细胞的破碎。不同的组织和细胞的破碎方法不同，可以采用物理和化学酶解等方法。

1. 物理法

1）加压破碎法：采用 20.59～34.32MPa 的压力，可以使 90%以上的微生物被压碎，该方法用于细菌等微生物的破碎。

2）匀浆器：把经过预处理的组织置于匀浆器内，加适量溶液匀浆。通常匀浆的次数与细胞破碎程度成正比。用此法细胞破碎程度比高速组织捣碎机高，对大分子的破坏也少，是粉碎少量软嫩材料（脑、胰、肝等）时常用的方法。

3）超声波处理法：多用于细菌和细胞性抗原的处理，处理样品的浓度与超声波频率相关。在处理大肠杆菌时，50～100mg/L 菌体，在 1～10kHz 频率下，作用 10～15min。超声波处理容易使溶液温度升高，导致不耐热的物质失活。为防止温度升高，除间歇开机外，可采用人工降温。另外在操作时避免溶液内存在气泡。

4）反复冻融法：该方法使用的原则是快冻慢融，将预处理的样本快速冷却到－80℃或置于液氮中，冻固后取出，缓慢解冻，反复冻融多次后，置显微镜下观察应未见完整细胞，该方法用于细胞的破碎。

2. 化学和生物化学法

1）自溶法：把抗原材料置于一定的 pH 和适宜的温度下，利用组织细胞自身的酶系统，使细胞内容物释放出来。一般动物细胞的自溶温度选在 0～4℃，需加少量防腐剂如氯仿等。自溶法时间较长，不易控制，一般不常用。

2）酶降解法：对于大肠杆菌等微生物，可以采用溶菌酶降解细菌的细胞壁，在每毫升含 2×10^8 个细胞的悬液中加 100μg～1mg 溶菌酶，37℃条件下作用 10min，可以破坏细菌的细胞壁。此外，蜗牛酶、纤维素酶也被选作破碎细菌细胞之用。对于动物细胞采用酶作用，主要是将组织中的细胞消化成单个细胞悬液，如采用胰蛋白酶、胶原酶等作用于肿瘤组织，可以将肿瘤组织中的细胞消化成单细胞，用于肿瘤抗原的制备。

3）表面活性剂处理法：较常用的有十二烷基磺酸钠、氯化十二烷基吡啶、去氧胆酸钠等，这些表面活性剂中含有亲脂性和亲水性基团，具有乳化、分散、增溶

的作用。

（三）抗原的提取

提取是指在抗原的分离纯化前期，将经过预处理或粉碎了的细胞置于一定条件和溶剂中，让被提取物充分释放出来，然后利用一种溶剂对不同物质的溶解度不同，从混合物中分离出一种或多种组分。该步骤贯穿于分离纯化的整个过程中，如在分离蛋白质和核酸过程中，用氯仿反复提取蛋白质，用苯酚反复抽提分离 DNA 和 RNA 等。影响提取的因素主要来自被提取物在提取的溶剂中的溶解度大小以及它由固相扩散到液相的难易。一般说来，极性物质易溶于极性溶剂，非极性物质易溶于非极性溶剂，溶剂 pH 远离大分子物质的等电点时溶解度增加。因此，在不同的抗原提取过程中，所选用溶剂的性质、pH、离子强度、提取的温度、介电常数等因素非常关键，在抗原的分离纯化中，必须充分考虑这些因素。

1. 水溶液提取

蛋白质抗原大部分溶于水、稀盐、稀酸和稀碱溶液，提取蛋白质以水溶液为主。稀盐液和缓冲液对蛋白质稳定性好，溶解度较大，是最常用的溶剂。提取时应注意下列几点：①盐浓度：常用等渗溶液为 0.02～0.05mol/L 磷酸盐缓冲液或碳酸盐缓冲液、0.15mol/L 氯化钠溶液等。②pH 的选择：蛋白质的溶解度和稳定性与溶液的 pH 关系很大。溶液的 pH 首先要保证在蛋白质稳定的范畴内，通常在等电点的两侧，碱性蛋白质如细胞色素 c 一般用稀酸提取，酸性蛋白质应选用偏碱的溶液。测定 pH 应注意其准确性，误差控制在±0.1。③温度：为防止活性蛋白质变性、降解，温度通常选在 4℃以下。对少数耐热的蛋白质，可适当提高温度，使杂蛋白质变性分离，有利于抗原的纯化提纯。

2. 有机溶剂提取

一些不溶于水、稀盐、稀酸或稀碱溶液的蛋白质抗原，可以用不同比例的有机溶剂来提取，包括乙醇、丙酮、氯仿及四氯化碳等。丁醇亲脂性强并兼有亲水性，一些与脂类结合较牢的蛋白质抗原用丁醇提取效果较好。

二、抗原的分离纯化

抗原的分离纯化是制备抗原的关键步骤，方法较多，技术也较复杂，一般必须根据抗原的特性，包括分子质量大小、等电点、蛋白质的极性等选择合适的分离纯化方法。主要包括盐析法、膜分离法，以及柱层析，尤其是柱层析技术如离子交换、凝胶过滤，以及亲和层析技术等，是获得高纯度抗原的关键。

（一）盐析法

1. 原理

蛋白质抗原在低盐浓度下的溶解度随着盐溶液浓度升高而增加，这个现象称为盐溶。当盐溶浓度不断上升，蛋白质的溶解度又以不同程度下降并先后析出沉淀，称为盐析。这一现象是由于蛋白质分子内及分子间电荷的极性基团的静电引力形成的，当盐浓

度较低时，溶液的极性增加，蛋白质在水中溶解度增大。但盐浓度增加到一定程度时，蛋白质表面的电荷被大量中和，水化膜被破坏，蛋白质相互聚集而沉淀析出。盐析法就是根据不同蛋白质在不同浓度的盐溶液中溶解度降低程度的不同而达到彼此分离的方法。盐析法的优点是应用范围广，对设备和条件要求不高，操作较为简便，成本较低但能达到一定的纯化目的。

2. 盐的选择

蛋白质盐析常用中性盐，主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。硫酸铵由于盐析能力强、溶解度受温度影响小而应用最为广泛，25℃时饱和溶解度为4.1mol/L，0℃时饱和溶解度为3.9mol/L，在这一溶解度范围内，许多蛋白质可以盐析出来，分段效果比其他盐好，并且不容易引起蛋白质变性。但应用硫酸铵对蛋白氮的测定有干扰，缓冲能力比较差，故有时也应用硫酸钠，也可以采用透析法进行脱盐。硫酸钠的缺点是30℃以上时溶解度太低，缓冲能力也较差，pH常为4.5～5.5，市售的硫酸铵常含有少量游离硫酸，pH往往在4.5以下，所以用其他pH进行盐析时，应采用硫酸或氨水调节。磷酸钠的盐析作用比硫酸铵好，但由于溶解度太低，受温度影响大，故应用不广。

3. 盐析法的注意事项

盐饱和度的影响：盐饱和度是影响蛋白质盐析的重要因素。在分段盐析时，加盐浓度一般以饱和度表示，饱和溶液的饱和度定为100%。当蛋白质溶液体积不大、所需调整的浓度不高时，可加入饱和硫酸铵溶液。饱和硫酸铵配制方法：加入过量的硫酸铵，加热至50～60℃，保温数分钟，滤去沉淀，0℃或25℃下平衡24～48h，有固体析出时即达100%饱和度。

（二）膜分离技术

膜分离技术包括超滤、反渗透析、电渗透、微孔过滤等，其中超滤技术应用最为广泛。超滤分离抗原主要是根据蛋白质分子质量大小进行分离。超滤膜可以在一定的压力下，使小分子物质透过规定孔径的超滤膜，而截留住大分子物质。该方法操作简便、成本较低，应用范围较广。目前不仅有工业化的超滤设备，也有实验室的超滤装置，可以方便地应用于抗原的浓缩、脱盐、除菌、去病毒和热源等。

（三）高速离心法

下列方法可以用于抗原的分离。①差速离心法：低速离心和高速离心交替进行，分离大小差异的抗原颗粒。②梯度密度离心法：是一种区带分离法，通过梯度密度离心，使各类分子质量的颗粒得以分离，也可以采用梯度柱的形式分离。该方法也可以用于病毒性抗原的分离制备。超速离心分离或梯度密度离心仅适用于少数大分子抗原及一些比重较轻的抗原，而不适用于大多数中、小分子抗原。

（四）离子交换法分离纯化抗原

离子交换层析（IEC）也称作吸附层析，是以具有离子交换性能的物质作固定相，利

用它与流动相中的离子进行可逆的交换性质来分离离子型化合物的一种方法。离子交换层析广泛应用于抗原的纯化，它具有同时分析多种离子化合物，灵敏度高、重复性、选择性好、分离速度快、交换容量大、相对成本低等优点，是当前最常用的蛋白质分离技术。

1. 原理

离子交换层析是溶液中离子与固相基质上的带相反电荷的配基之间依靠静电力相互作用的过程，是一个可逆的过程。根据 Coulomb 定律，$F = Z_a Z_b / Dr^2$，式中 F 为静电力；Z 为离子电荷数或分子质量；D 为溶液的介电常数；r 为电荷间的距离。静电力随离子电荷数的增加而增强。例如，二价离子的相互作用比单价离子相互作用更强，价数相同时，原子序数越高，结合力越大。静电力随介电常数的减小而增强。例如，两电荷相反的分子之间的作用在有机溶液（D=20）中比在水（D=80）中更强。静电力随电荷间距离的增加而减弱。

除库仑力外，对蛋白质和离子交换基质之间的相互作用力有显著贡献的还有范德华力。要成功运用离子交换层析技术，就必须知道目标蛋白的等电点（pI）。蛋白质解离成正、负离子的趋势相等，即净电荷为零时的溶液的 pH 称为蛋白质的等电点。当pH＜pI 时，蛋白质带正电荷，能被阳离子交换剂吸附；pH＞pI 时，蛋白质带负电荷，能被阴离子交换剂吸附。一般 pI 越大的蛋白质与离子交换剂结合力越强。因此应根据蛋白质分子所带电荷性质选择合适的离子交换剂，但由于生物样品的复杂性以及其他因素影响，一般生物大分子与离子交换剂的结合情况较难估计，往往要通过实验进行摸索。

大多数蛋白质的等电点大于 7，被称为酸性蛋白质，反之被称为碱性蛋白质。要将蛋白质从离子交换剂上解吸附，就要减小电荷间的作用力，可以通过增加离子强度（增加介电常数）或减小 pH（减少蛋白质电荷）来实现。但是，如果蛋白质过长时间（如过夜）吸附到基质上就更难洗脱下来。这有可能是蛋白质构象发生改变，导致和基质间产生了其他的结合力。

2. 离子交换法纯化抗原基本方法

Ⅰ. 离子交换剂的选择

离子交换剂的种类很多，离子交换层析要取得较好的效果首先要选择合适的离子交换剂。首先是对离子交换剂电荷基团的选择，确定选择阳离子交换剂还是选择阴离子交换剂。选择阳离子交换剂还是阴离子交换剂应考虑蛋白质本身的稳定性，及目标蛋白和样品中任何其他分子的结合特性。主要取决于被分离的物质在其稳定的 pH 下所带的电荷，如果带正电，则选择阳离子交换剂；如带负电，则选择阴离子交换剂。例如，待分离的蛋白质等电点为 4，稳定的 pH 范围为 6～9，由于这时蛋白质带负电，故应选择阴离子交换剂进行分离。强酸或强碱型离子交换剂适用的 pH 范围广，常用于分离一些小分子物质或在极端 pH 下的分离。由于弱酸型或弱碱型离子交换剂不易使蛋白质失活，故一般分离蛋白质等大分子物质常用弱酸型或弱碱型离子交换剂。

其次是对离子交换剂基质的选择。聚苯乙烯离子交换剂等疏水性较强的离子交换剂一般常用于分离小分子物质，如无机离子、氨基酸、核苷酸等。而纤维素、葡聚糖、琼脂糖等离子交换剂亲水性较强，适合于分离蛋白质等大分子物质。一般纤维素离子交换

剂价格较低，但分辨率和稳定性都较低，适于初步分离和大量制备。葡聚糖离子交换剂的分辨率和价格适中，但受外界影响较大，体积可能随离子强度和 pH 变化有较大改变，影响分辨率。琼脂糖离子交换剂机械稳定性较好，分辨率也较高，但价格较贵。

另外离子交换剂颗粒大小也会影响分离的效果。离子交换剂颗粒一般呈球形，颗粒的大小通常以目数（mesh）或者颗粒直径（mm）来表示，目数越大表示直径越小。离子交换层析柱的分辨率和流速也都与所用的离子交换剂颗粒大小有关。一般来说，颗粒小，分辨率高，但平衡离子的平衡时间长，流速慢；颗粒大则相反。所以大颗粒的离子交换剂适合于对分辨率要求不高的大规模制备性分离，而小颗粒的离子交换剂适于需要高分辨率的分析或分离。

Ⅱ. 用离子交换层析法纯化抗原方法和要点

蛋白质样品的准备

1）使样品澄清：颗粒物质的存在会影响柱子的吸附性和寿命，因此应使颗粒大小小于 50μm。样品用 0.45μm 膜过滤，若需要无菌的话，用 0.22μm 的膜过滤。当颗粒大小为 90μm 或更大时，用 1μm 的膜过滤即可。

2）调节样品 pH 与结合缓冲液相同：样品的 pH 或离子强度与结合缓冲液不同时可能导致蛋白质不结合离子交换剂。可通过将样品过脱盐柱或超滤来校正。

调整样品离子强度等于或低于结合缓冲液：在样品量不是很多的情况下，最简单的方法是将样品用结合缓冲液稀释 5～10 倍来校正样品的 pH 和离子强度。也可以先用水稀释样品再用酸或碱来调节 pH。

核酸的存在会减少阴离子交换剂对蛋白质的结合量：即使在 pH<3 时，核酸仍带负电荷，因此可在 pH 为 3 时先让样品通过阴离子交换剂以消除核酸的影响。大多数蛋白质在这个 pH 时带正电荷，而不与阴离子交换剂结合。也可以将蛋白质溶液在过滤前用核酸酶去除核酸，或用 1%（质量体积比）链霉素盐溶液与核酸共沉淀后再离心以去除核酸。

抗原纯化的要点

首先，蛋白质浓度若大于 30～40mg/ml 时，因太过黏稠而容易破坏离子交换柱，可通过降低流速来避免这种情况的发生。当过高浓度的蛋白质溶液经过离子交换柱时，如果有过量的蛋白质结合到基质上，会导致柱子上端形成一个新的界面，这可能会屏蔽一些功能基团，导致吸附一些不需要的杂质，并在层析图中出现假峰。另外蛋白质浓度过高时，蛋白质与基质结合过程中会引起 pH 的快速变化而导致一些蛋白质解吸附。可以通过上样前稀释样品来避免这种情况的发生。

此外，温度也是离子交换层析中一个比较容易忽略的参数。在层析过程中以下过程经常发生：蛋白质迁移到结合位点、蛋白质的吸附与解吸附、蛋白质从一个位点移动到另一个位点。要成功进行离子交换层析，就要平衡这些过程。达到平衡的时间由蛋白质的扩散系数决定，蛋白质扩散系数由温度和溶液黏度同时决定。当温度增加 10℃时平衡速率将增加 1 倍。这就意味着在同样流速下，在寒冷的室内（0～4℃）通过层析柱的时间为在室温（20～25℃）的 3～4 倍。溶液的黏度在 4℃下增加，主要是因为水在 4℃下的黏度比在室温下增加 70%以上。

上样方法要点

上样，通常以低于特定柱子规定的流速上样，因为和缓冲液相比，样品的黏度更大。通常基质和柱子的线性流速最大为150cm/h。上样速度应控制在50～100cm/h。

小量样品可用带固定毛细管的试样环管。样品体积达到150ml时，常用10ml、50ml、150ml的环管。大量体积样品可用泵直接将样品加到柱子上，流出液可收集后再过柱子。

用大于5倍床体积的结合缓冲液洗涤柱子，直到流出液中监测不到蛋白质为止。

大多数情况下，用5倍床体积的结合缓冲液洗涤柱子即可。但有时需要用多于5倍床体积的量来彻底洗去非特异性结合的蛋白质。

要更有效地洗脱没有结合到基质上的蛋白质可以先暂停洗脱柱子15min，让这些蛋白质从小球表面扩散开。另一个有效的方法是加大洗脱缓冲液的量，这样，轻轻结合到基质上的蛋白质可以被洗脱下来，但要特别注意避免把目的蛋白洗脱下来。

洗脱方法要点

用浓度为0～100%线性浓度梯度的盐溶液（如NaCl）从柱子上洗脱目的蛋白，洗脱液体积为20倍床体积。

目的蛋白在流出液中，结合到柱子上的蛋白质不纯时：当选择的离子交换条件使得样品中大部分非目的蛋白结合到柱子上，不改变洗涤液，洗脱得到的流出液里即含有目的蛋白。

无梯度洗脱：当目的蛋白与样品中其他蛋白质成分在同样条件下出峰时间不同可用无梯度洗脱方法。无梯度洗脱不需要梯度装置，完全是利用离子交换的特性来达到最佳的分离效果。但是，用无梯度洗涤时，分离时间增加会导致尾峰的出现和谱峰明显变宽。

梯度洗脱和阶段洗脱：是通过增加离子强度或改变pH来改变目的蛋白的带电基团与基质的亲和性。

用2mol/L NaCl洗涤柱子直到UV监测仪上的峰值稳定在一个较低的水平。经过持续一段时间的洗涤后，背景还是很高的话，暂停洗涤，让蛋白质自身从基质上解吸附，然后继续用盐溶液洗涤。用结合缓冲液平衡柱子直到流出液的电导率及pH和结合缓冲液的相同。

3. 离子交换层析法纯化重组腺病毒

以下以纯化重组腺病毒为例，介绍离子交换层析法的过程。

材料与试剂

起始平衡液：20mmol/L Tris-HCl，pH8.0（1mmol/L $MgCl_2$ 和0.25mol/L NaCl）

洗脱液：0.25～1mol/L NaCl

Source15™Q阴离子交换树脂（GE Healthcare）

Tricorn 10/100层析柱（GE Healthcare）

AKTApurifier 900纯化系统（GE Healthcare）

步骤

1）样品准备：收集接种了重组腺病毒的HEK293细胞，进行3次反复冻融，4℃下4000g离心30min，去除细胞碎片。过离子交换柱前样品初提液先用0.22μm

无菌 Millex-GS 过滤器（Millipore，USA）过滤。

2）装柱：将 8ml Source15™Q 强阴离子交换树脂装入 Tricorn-10/100 层析柱。

3）平衡：用 20mmol/L Tris-HCl 溶液（即起始缓冲液，pH8.0）平衡Source15™Q阴离子交换树脂，至流出液体的 pH 与加入的起始缓冲液的 pH 相近时为止。

4）上样：上样前调节重组病毒样品使其电导率（用 NaCl 调节）及 pH 和平衡液的相同，60ml 样品初提液经过阴离子交换层析柱。样品全部上完后，再用 5 倍于床体积的起始平衡液冲洗柱子。

5）洗脱液的收集：用 0.25～1mol/L NaCl 梯度范围的洗脱液对柱子进行连续梯度洗脱，洗脱流速控制在 3ml/min，洗脱液体积为 20 倍床体积。收集组分。用实时荧光定量 PCR 法测定经阴离子交换层析法纯化后的腺病毒颗粒含量。

（五）凝胶过滤层析

凝胶层析又称为凝胶排阻层析、分子筛层析、凝胶渗透层析等。它是以多孔性凝胶填料为固定相，按分子大小顺序分离样品中各个组分的液相色谱方法。凝胶层析是生物化学中一种常用的分离手段，它具有设备简单、操作方便、样品回收率高、实验重复性好，特别是不改变样品生物学活性等优点，因此广泛用于蛋白质（包括酶）、核酸、多糖等生物分子的分离纯化，同时还应用于蛋白质分子质量的测定、脱盐、样品浓缩等。

1. 原理

用于凝胶过滤法中的凝胶基质具有立体网状结构，筛孔颗粒一致，且呈柱状颗粒。筛孔的大小有一个严格控制的范围，取决于凝胶基质理化性质。凝胶孔的分离是对一定范围的分子大小的选择。凝胶颗粒孔径的大小决定分离物质分子大小的范围。大分子物质由于直径较大，不易进入凝胶颗粒的微孔，而只能分布于颗粒之间，所以在洗脱时向下移动的速度较快，也就说分子大的先流出柱子。小分子物质除了可在凝胶颗粒间隙中扩散外，还可以进入凝胶颗粒的微孔中，在向下移动的过程中，从一个凝胶内扩散到颗粒间隙后再进入另一凝胶颗粒，如此不断地进入和扩散，直径越小的分子在凝胶内扩散的速度越慢，在柱中停留的时间也越长。直径比凝胶最小孔小的分子能进入凝胶的全部孔隙。

2. 凝胶过滤常用填料种类

1）葡聚糖凝胶（polydextran）。商品名称是 Sephadex。polydextran 几乎不溶于溶剂中，亲水性强，能迅速在水和电解质溶液中膨胀，在碱性环境中十分稳定，所以可以用碱去除凝胶上的污染物。Sephadex G-*X*，*X* 表示葡聚糖的交联程度，数值越大则交联度越小，但吸水量越高，*X* 值大致是吸水量的 10 倍。以 Sephadex G-25 为例，表示 1g 干燥的 G-25 凝胶可以吸水 2.5ml。

2）琼脂糖凝胶。商品名很多，常见的有 Sepharose（瑞典，Pharmacia）、Bio-Gel-A（美国 Bio-Rad）等。琼脂糖凝胶依靠糖链之间的次级链如氢键来维持网状结构，网状结构的疏密依靠琼脂糖的浓度。其化学稳定性不如葡聚糖凝胶。在 pH4～9，温度 0～40℃时稳定。琼脂糖凝胶在 40℃以上开始融化，也不能高压消毒，可用化学灭菌处理。它能分离几万至几千万高相对分子质量的物质，特

别适用于核酸类、多糖类和蛋白质类生化药物的分离，弥补了葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶的不足。

3）聚丙烯酰胺凝胶。聚丙烯酰胺凝胶的商品为生物胶-P（Bio-Gel P），是一种人工合成凝胶，是以丙烯酰胺为单位，由甲叉双丙烯酰胺交联而成，经干燥粉碎或加工成型制成粒状，控制交联剂的用量可制成各种型号的凝胶。交联剂越多，孔隙越小。其稳定性比葡聚糖凝胶好，在 pH2～10 范围内使用。

4）聚苯乙烯凝胶。商品名为 Styrogel，具有大网孔结构，可用于分离相对分子质量为 1600～40 000 000 的生物大分子，适用于有机多聚物的相对分子质量测定和脂溶性天然物的分级，凝胶机械强度好，洗脱剂可用甲基亚砜。

3. 影响凝胶层析的因素

1）凝胶的选择：分离程度主要决定于凝胶颗粒内部微孔的孔径和混合物相对分子质量的分布范围这两个因素。

2）洗脱液流速：洗脱时流速要严格控制，否则收集的每一部分洗脱体积就不会恒定，理想的分配系数就难以测出。一般采用 30～200ml/h。流速太快，色层谱变形，影响分离效果，太慢则会因扩散加剧而影响分离效果。

3）离子强度和 pH：离子强度和 pH 的高低都会影响分离效果，处理碱性蛋白质时，洗脱液中必须含有一定的离子强度；在酸性 pH 时，碱性物质易于洗脱。多糖类物质洗脱以水最佳。

4. 凝胶过滤层析纯化重组腺病毒

以下以纯化重组腺病毒为例，介绍凝胶过滤层析法的过程。

材料与试剂

平衡液：10mmol/L Tris-Cl（pH7.5），1mmol/L $MgCl_2$，10% 甘油

凝胶过滤层析填料 Sephadex G-100 SF（Amersham Biosciences，Uppsala，Sweden）

层析柱 Econo-Pac polypropylene column（BIO-RAD，Hercules，CA）

步骤

1）装柱：将 Sephadex G-100 SF 装入 Econo-Pac polypropylene column 中，最大柱床体积 20ml。

2）平衡：用至少 3 个柱床体积的平衡液平衡层析柱。

3）上样和洗脱：用上样环上样 5ml，用洗脱液（同平衡液）洗脱，流速 1ml/min。按照 260nm 紫外吸收曲线及洗脱体积分峰收集。所要的目的蛋白在洗脱 5～6ml 时出现。

4）结果：分析目的蛋白的纯度和基本特征，采用 SDS-PAGE 和银染的方法分析层析柱收集的洗脱峰。

（六）亲和层析

生物分子间存在很多特异性的相互作用，它们之间都能够专一且可逆地结合，这种结合力就称为亲和力。亲和层析（affinity chromatography，AC）是利用偶联亲和配基的亲

和吸附介质为固定相亲和吸附目标产物，使目标产物得到分离纯化的液相层析法。亲和层析已经广泛应用于生物分子的分离和纯化，如结合蛋白、酶、抑制剂、抗原、抗体、激素、激素受体、糖蛋白、核酸及多糖类等；也可以用于分离细胞、细胞器、病毒等。

1. 原理

亲和层析就是通过将具有亲和力的两个分子中一个固定在不溶性基质上，利用分子间亲和力的特异性和可逆性，对另一个分子进行分离纯化。被固定在基质上的分子称为配体，配体和基质是共价结合的，构成亲和层析的固定相，称为亲和吸附剂。亲和层析时首先选择与待分离的生物大分子有亲和力的物质作为配体，并将配体共价结合在适当的不溶性基质上。将制备的亲和吸附剂装柱平衡，当样品溶液通过亲和层析柱的时候，待分离的生物分子就与配体发生特异性地结合，从而留在固定相上；而其他杂质不能与配体结合，仍在流动相中，并随洗脱液流出，这样层析柱中就只有待分离的生物分子。通过适当的洗脱液将其从配体上洗脱下来，就得到了纯化的待分离物质。

抗原和抗体的作用具有高度的专一性，并且它们的亲和力极强。因此用适当的方法将抗体结合到层析剂上，便可有效地分离和纯化各自互补的抗原。这种以抗原抗体中的一方作为配基亲和吸附另一方的分离系统称为免疫亲和层析（immunoaffinity chromatography，IAC）。亲和层析技术最先是由 Cuatrecasa 等建立（1968）。

免疫亲和纯化一般分为 3 个步骤：①抗体亲和层析柱的制备；②将抗原结合到抗体-微珠基质上；③从层析柱上洗脱抗原。

2. 抗体亲和层析纯化抗原的基本方法

Ⅰ. 抗体交联

将抗体结合到层析介质（如蛋白 A、蛋白 G 或活化的 Sepharose 4B 等微珠）上。一般情况下，每毫升蛋白 A 或蛋白 G 微珠大约可以结合 2mg 单克隆抗体或经亲和层析纯化的多克隆抗体。每毫升活化的 Sepharose 4B 微珠可以结合 10～40mg 抗体。

1）用 0.2mol/L 硼酸钠缓冲液（pH9.0）将 2mg 抗体调节到 5～10ml，加入 1ml 蛋白 A 或蛋白 G 微珠，混合成为稀薄的浆状，室温孵育 1h，不时轻轻摇动混匀。留少量抗体溶液以备电泳分析交联效果。不用磁力搅拌器，以免破坏微珠。

2）3000*g* 离心 2min 或 10 000*g* 离心 30s，去上清。留少量上清以备电泳分析交联效果。用 10ml 0.2mol/L 硼酸钠（pH9.0）同样离心洗涤微珠 2 次。

3）用 10ml 0.2mol/L 硼酸钠（pH9.0）重悬微珠。加入固体二甲基庚二酸酯（DMP）至终浓度为 20mmol/L。室温孵育 30min，并不时轻轻混匀。使结合在蛋白 A 或蛋白 G 微珠上的抗体与微珠基质发生交联。同样离心，去上清。留少量混悬液以备电泳分析交联效果。

4）用 10ml 0.2mol/L 乙醇胺（pH8.0）洗涤微珠 1 次，终止交联反应。然后重悬于 10ml 0.2mol/L 乙醇胺溶液中，室温孵育 2h，并不时轻轻混匀。用 PBS 洗涤微珠后，重悬于 PBS，加入硫柳汞至 0.01%，4℃保存。

5）10%SDS-PAGE 交联前后预留的样品，并用考马斯亮蓝染色，检查交联效果。如果交联效果良好，则在交联前的样品中显示 55kDa 的重链条带，而交联后的

样品无此条带。如果抗体已纯化，可对预留的样品中的抗体蛋白进行定量，以了解交联到微珠上的抗体的量。

Ⅱ. 结合抗原

1）将交联抗体的微珠转入合适的层析柱中，用 PBS 冲洗容器，收集残留的微珠再加入层析柱。抗体微珠基质的量以仅能纯化样品中全部抗原为宜。

2）用 20 倍柱床体积与待纯化抗原溶液相同的缓冲液（通常为 PBS）洗柱。

3）将待纯化抗原溶液加入层析柱，按 0.5～1ml/min 的流速，使抗原溶液流过层析柱，用蠕动泵控制流速。

4）用 20 倍柱床体积的结合缓冲液（通常为 PBS）洗柱，洗去未结合的杂蛋白。

Ⅲ. 洗脱抗原

1）用 20 倍柱床体积的预洗脱缓冲液洗柱。

2）采用分段洗脱法，连续以 0.5 倍柱床体积的洗脱缓冲液通过层析柱，分管收集每一组分。如果使用过高或过低 pH 的缓冲液洗脱，收集管内需加入 0.1 倍柱床体积的中和缓冲液。

3）检测每管的抗原含量，将浓度高的各管合并。根据抗原的用途，需对收集的抗原洗脱液透析。

4）用 20 倍柱床体积的起始缓冲液流经基质，使层析柱再生。加入终浓度为 0.01%的硫柳汞，可长期保存于 4℃下。

免疫亲和层析在实验室被广泛用于蛋白质的分离纯化，目前在大规模生产治疗产品方面，IAC 的应用受到价格、配体的渗漏和 IAC 吸附剂的抗原结合容量低等问题的限制。

单克隆抗体问世后，不少生物技术公司研制适宜于培养杂交瘤细胞的生物反应器及其培养基，这些大规模生产单克隆抗体技术的建立和不断完善将降低 IAC 吸附剂的价格。

随着新的合成基质和偶联化合物的出现以及对 IAC 研究的深入，免疫亲和色谱在工业性生产纯化蛋白质的应用将逐渐得到发展。

3. 免疫亲和层析纯化骨肉瘤相关抗原

以下以纯化骨肉瘤相关抗原为例，介绍亲和层析的过程。

材料与试剂

产生抗骨肉瘤相关抗原（5D3Ag）单克隆抗体的杂交瘤细胞

BALB/c 小鼠

降植烷

偶联缓冲液：0.5mol/L NaCl，0.1mol/L $NaHCO_3$，pH8.3

洗脱液：0.1mol/L 盐酸甘氨酸（Gly-HCl），pH3.0

0.1mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液

0.5mol/L NaCl，0.1mol/L pH4.0 乙酸缓冲液

0.5mol/L NaCl，0.1mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液

CNBr 活化的 Sepharose 4B（Pharmacia）

低压液相层析系统（Econo Bio-Rad），蛋白 A 预装柱（Bio-Rad）

步骤

1）抗体制备：取 6～10 周龄雌性 BALB/c 小鼠，腹腔注射降植烷，每只 0.5ml，1 周后腹腔注射杂交瘤细胞，每只 3×10^6 个（悬于 0.5ml 生理盐水）。待产生较多腹水后，处死小鼠，取腹水，4℃下 10 000g 离心 30min，除去细胞沉淀，待用。

2）腹水中 IgG 的纯化：先用饱和硫酸铵沉淀法粗纯化，再用蛋白 A 柱层析法分离纯化 IgG（见第七章）。

3）免疫亲和层析柱的制备：用 50 倍量偶联缓冲液透析纯化的 IgG 24h，其间换液 2 或 3 次。称取 1.7g 冻干的 CNBr 活化 Sepharose 4B，用 1mmol/L HCl 洗涤 15min。把准备好的凝胶和 IgG 混合（每毫升湿的活化 Sepharose 4B 微珠可以结合 10～40mg IgG），4℃摇动过夜。用至少 5 倍凝胶体积的偶联缓冲液洗掉未偶联的抗体。在 0.1mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液中封闭凝胶上残存的活性基团 2h 以上。分别用 0.5mol/L NaCl，0.1mol/L pH4.0 乙酸缓冲液和 0.5mol/L NaCl，0.1mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液交替洗凝胶 3 个循环，充分洗掉未结合的蛋白质。收集所有液体检测蛋白质浓度，计算未结合的抗体量和抗体偶联率：偶联率=(总蛋白质量－剩余蛋白质量）/总蛋白质量。

4）将结合抗体的 Sepharose 4B 凝胶装柱，用样品缓冲液（pH7.4 PBS）充分流洗至流出液 OD 值小于 0.001。取少量凝胶颗粒，用荧光标记的兔抗鼠抗体染色，荧光显微镜或 FACS 检测抗体偶联效果。

5）免疫亲和层析柱纯化骨肉瘤相关抗原 5D3Ag：将骨肉瘤 OS-9607 细胞的裂解物小心地加入层析柱，4℃结合过夜。利用 Econo 层析系统进行洗脱。洗脱条件为：柱体积 8ml，流速 0.5ml/min，上样量 1.5ml，UV 波长 280nm。首先用 10 倍柱体积的 PBS 液充分洗去未结合的杂蛋白至流出液吸光值小于 0.001，再用 0.1mol/L pH3.0 Gly-HCl 洗脱液洗柱，使特异性结合在抗体柱上的蛋白质（5D3Ag）洗脱下来，收集洗脱峰。在收集管中加 1/10 洗脱液量的 1mmol/L pH8.0 Tris-HCl 中和洗脱液防止蛋白质变性。将得到的洗脱液浓缩，BCA 法测蛋白质浓度，－80℃冻存备用或以冻干粉状态长期保存。

三、抗原的浓缩

通过以上步骤分离纯化的抗原，必须经过浓缩后才能保存，以备后续的实验使用。浓缩是低浓度溶液通过除去溶剂（包括水）变为高浓度溶液的过程。上述方法中涉及的盐析等方法，广义上来说也是一种浓缩，即经过沉淀后再调整为合适的浓度。但有时经过柱层析分离纯化的抗原，往往被大量的洗脱液稀释，溶液体积、抗原浓度较低，往往需要采用其他方法进行浓缩。

（一）蒸发法

蒸发是溶液表面的溶剂分子获得动能脱离液面逸向空间的过程。当溶液受热，液体中溶剂分子动能增加，蒸发过程加快。蒸发的快慢与温度、蒸发面积、液体表面积、液

面蒸汽分子密度，即蒸汽压大小有关。蒸气浓缩装置常按照加热、扩大液体表面积、低压和加速空气流动等因素而设计。

（二）吸收法

通过吸收剂直接吸收溶液中的溶剂分子使溶液浓缩。其中使用的吸收剂与溶液不能起化学反应，对抗原的分子没有吸附作用，易与溶液分开。目前实验室中常用的吸收剂有聚乙二醇、聚乙烯吡咯酮、蔗糖和凝胶等。在使用凝胶浓缩时，凝胶粒度大小应恰好使溶剂及低分子物质能渗入凝胶内，而抗原分子排除于凝胶之外。将洗净和干燥的凝胶直接投入待浓缩的溶液中，当凝胶在水中溶胀时，溶剂及小分子被吸收到凝胶内，抗原大分子留在剩余的溶液中，通过离心或过滤除去凝胶颗粒，就可以浓缩抗原溶液。凝胶溶胀时对生物大分子结构和生物活性都没有影响，这是近年来生物化学及分子生物学广泛使用的浓缩和分离方法之一。

使用聚乙二醇等其他吸收剂时，需先将抗原溶液装入半透膜的透析袋里，外加聚乙二醇，袋内溶剂渗出即被聚乙二醇迅速吸去，聚乙二醇被溶剂饱和后可以重新更换新的聚乙二醇，直到抗原溶液被浓缩至所需的浓度为止。溶剂饱和的聚乙二醇经过加热除去溶剂便可再次使用。用作吸收剂的为大分子聚乙二醇，通常用 PEG6000。

（三）超滤法

如前所述，蛋白质抗原的稀溶液通过超滤一般可浓缩到 10%～15%浓度，回收率高达 90%。超滤法应用关键在于膜选择。不同类型、不同规格的膜，水的流速［在规定压力下以 $ml/(cm^2 \cdot h)$ 或 min^{-1}表示］、分子质量截止值（即大体上能被膜保留最小分子质量数值）等参数均不同，必须根据工作的需要来选用。

四、抗原的保存

抗原在分离纯化和浓缩后，应采取合适的方法保存，一般可分干态保存和液态保存。由于温度对蛋白质抗原的影响较大，在绝大多数情况下应采取低温保存。另外保存的抗原一般需加入防腐剂和稳定剂，常用的防腐剂有甲苯、苯甲酸、氯仿等，稳定剂有蔗糖、甘油等，也可以加入白蛋白类的保护剂，用于保持蛋白质抗原的活性和稳定性。

长期保存的抗原或者在以后的研究中具有相应要求的抗原经纯化后必须经过灭菌处理，实验室对于抗原常用的灭菌方法主要采用过滤除菌，微孔滤膜的孔径应低于 0.2μm。选取滤膜的孔径应考虑到抗原的浓度、溶液的黏稠度等。必要时，可先用较大孔径（0.45μm 或 0.8μm）的滤膜预过滤，再用 0.2μm 或 0.22μm 孔径的滤膜过滤除菌。

液态保存：液态储藏的优点是简便易行，不用干燥处理，抗原的生理活性和结构破坏较少，缺点是需要较严格的防腐措施，储藏时间较短。

干态保存：蛋白质抗原通过干燥处理的制品一般比较稳定，如制品含水量很低，在低温情况下，抗原分子的活性可保持数个月甚至数年。目前常用的方法包括冷冻干燥、常压干燥、减压干燥等。常压干燥和减压干燥操作简便、成本低，不需要特殊的设备，但冷冻干燥效果较好，蛋白质抗原的活性保持时间长。

冷冻干燥是在低温和高真空下，将抗原溶液中的水分直接升华干燥，通过冷冻干燥

的抗原，含水量可以低至1%～3%，并且在溶液中可以添加保护剂，较长时间维持蛋白质抗原的结构和活性。

五、抗原的鉴定

纯化抗原的鉴定包括蛋白质含量、理化性质、纯度、免疫活性，以及抗原本身功能的检测等，其中蛋白质抗原的含量测定可以采用BCA法、紫外分光法等。

蛋白质抗原的纯度和理化性质可以采用电泳、分光光度法和蛋白质印迹法，详见本书第二十一章。

第二节　人工抗原的制备原理

一、人工结合抗原

将无免疫原性或者弱免疫原性但具有抗原性的简单化学基团与载体偶联，形成载体-半抗原的结合物，这种方法称为人工结合抗原。如一些小分子多肽、某些药物等仅能与相应的抗体发生结合反应，但不能刺激机体产生抗体，将这些半抗原与大分子载体结合后，则可以刺激机体产生相应的抗体。人工结合抗原的制备主要涉及载体和偶联剂。

（一）蛋白质载体

蛋白质载体是目前应用较多的人工抗原结合载体，常用的有人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、钥孔戚血蓝素（KLH）等。这些蛋白质载体免疫原性较强，以牛血清白蛋白最常用。蛋白质与半抗原的结合基于游离氨基、羧基、酚基、巯基、吲哚基、咪唑基、胍基等活性基团的缩合。

（二）多肽类聚合物

常用多聚赖氨酸、多聚谷氨酸、多聚混合氨基酸等，这些多聚物分子质量达十几万至几十万，与半抗原结合后可诱发动物产生高亲和力、高特异性及高滴度的抗血清。

（三）大分子聚合物和某些颗粒

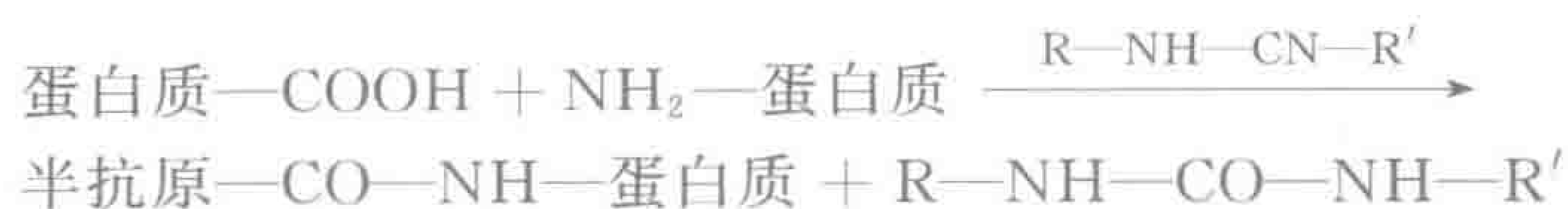
聚乙烯吡咯烷酮、活性炭等，大分子聚合物都可与半抗原结合，加入弗氏佐剂可诱导动物产生高效价的抗体。

（四）半抗原-载体的连接方法

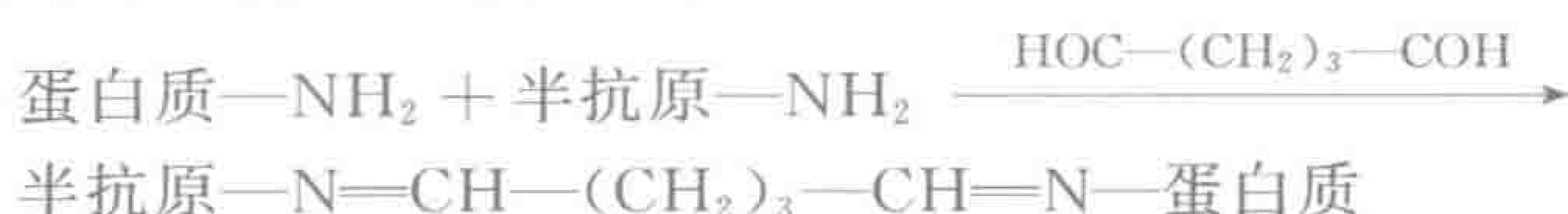
半抗原与载体的连接通常可用物理和化学方法进行。物理吸附的载体有羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等，它们借电荷和微孔吸附半抗原。化学法则是利用某些功能基团把半抗原连接到载体上，半抗原带有游离氨基、游离羧基或两种基团，可直接与载体连接。不带有氨基或羧基的半抗原，需使其转变为带有游离氨基或游离羧基的衍生物，才能与载体连接。

1）目前半抗原与载体的连接方法包括碳化二亚胺法、戊二醛法、混合酸酐法、过碘酸氧化法等。

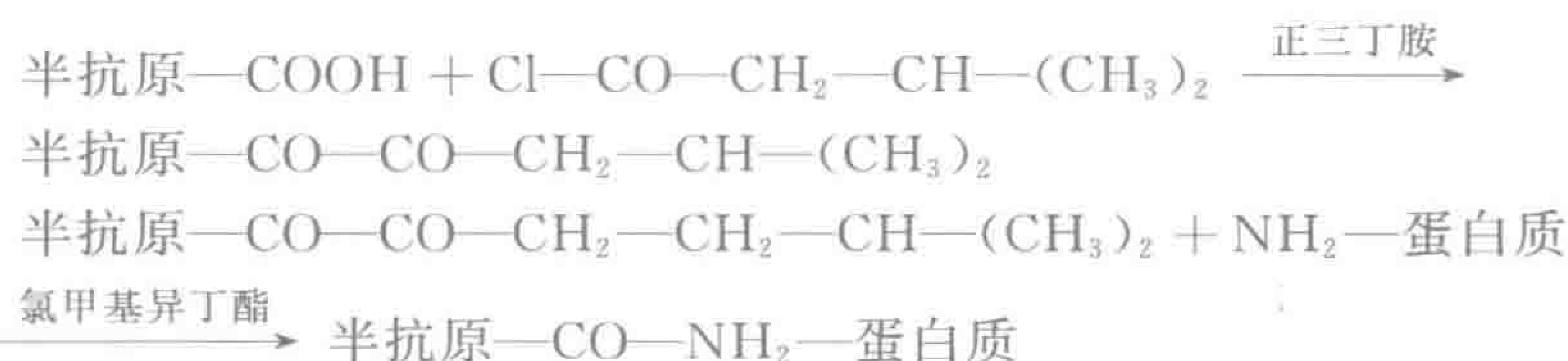
(1) 碳化二亚胺法：碳化二亚胺既可与半抗原上的羧基又可与半抗原上的氨基缩合。将半抗原与载体蛋白按一定分子比混合在适当的溶液中，然后加入碳二亚胺，搅拌1～2h，置室温反应24h，透析除去未反应的半抗原，即可得到人工结合抗原。



(2) 戊二醛法：戊二醛是带有两个活性醛基基团的双功能偶联剂，它借助两端的醛基与载体和半抗原的氨基以共价键连接，其反应如下：



(3) 混合酸酐法：混合酸酐法又称为氯甲基异丁酯法，以烷基氯甲基为偶联剂，最常用的是氯甲基异丁酯，主要用于甾体激素与蛋白质的偶联。含有羧基的半抗原与氯甲基异丁酯反应形成混合酸酐，然后再与蛋白质载体上的氨基反应形成肽键。其反应如下：



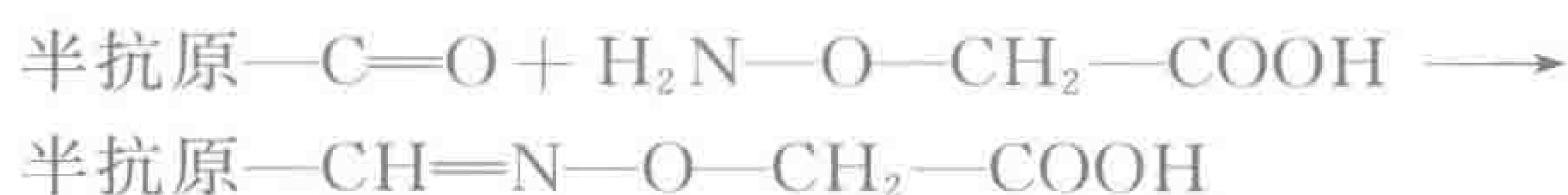
(4) 过碘酸氧化法：首先用过碘酸将糖环氧化成双醛基，再与蛋白质上的氨基偶联，该方法常用于配糖体类药物与蛋白质的偶联。

2) 带有氨基或羧基的半抗原需改造后，再用上述方法进行连接。

(1) 琥珀酸酐法：本法用于带有羟基的半抗原的改造。琥珀酸酐加水转变成琥珀酸。如将带有羟基的半抗原和琥珀酸酐在无水吡啶中反应，即可得到带有羧基的半抗原琥珀酸的衍生物。其反应式如下：



(2) 羧甲基羟胺法：带有酮基的半抗原（如孕酮、睾酮）与*O*-(羧甲基)羟胺反应，转变为带有羧基的半抗原衍生物。其反应式如下：



(3) 重氮化的对氨基苯甲酸法：本法适用于带有酚基的半抗原（如某些药物）的改造。起初将对氨基苯甲酸和亚硝酸钠反应，然后反应产物再作用于带有酚基的半抗原，从而制得带有羧基的半抗原衍生物。

(4) 一氯乙酸钠：本法适用于带有酚基半抗原的改造。将带有酚基的药物与一氯乙酸钠反应即可得到带有羧基的半抗原衍生物。

(五) 佐剂的使用

佐剂是一种能够增强抗原诱导的免疫应答的强度或者改变免疫应答类型的物质。佐

剂一般可以分为两大类，一类是化合物类，包括不完全弗氏佐剂（羊毛脂与石蜡油的混合物）、氢氧化铝、明矾、矿物油、Tween80，以及人工合成的多聚肌苷酸：胞苷酸(poly I：C)、脂质体等。另一类是生物佐剂，如卡介苗、短小棒状杆菌、百日咳杆菌等经处理或改造的细菌及其代谢产物等，以及细胞因子及热激蛋白等。

目前实验研究中应用最多的是弗氏佐剂（Freund adjuvant)。弗氏佐剂可以分为不完全弗氏佐剂和完全弗氏佐剂。不完全弗氏佐剂是液体石蜡与羊毛脂按照1：1～5：1（通常为2：1）混合而成。在不完全佐剂中加卡介苗或死的结核分枝杆菌，即为完全弗氏佐剂（FCA)。一般第一次免疫动物时按等体积的弗氏佐剂和抗原进行乳化，第二次或第三次免疫时可以用不完全佐剂或不用佐剂。

在免疫动物前，先将弗氏佐剂与抗原按1：1的比例混合，制备成“油包水”乳状液。注射入动物体内时一定要保持乳化状态。佐剂与抗原乳化方法如下，也可参见第七章。

1. 研磨法

将佐剂加热并放入无菌的玻璃研钵内，冷却后逐滴加入等体积的抗原溶液，滴的同时按同一方向研磨。抗原全部加入后，继续研磨直至成为乳白色黏稠的油包水乳剂。该方法适于制备大量的佐剂抗原，缺点是抗原损失较大。

2. 注射器混合法

将等体积的弗氏佐剂和抗原溶液分别吸入两个注射器内，两个注射器之间用一根细硅胶管相连，然后交替推动两个注射器针管，直至形成黏稠的乳剂为止。该方法的优点是可以无菌操作，抗原损失少，适用于制备少量的抗原乳剂。缺点是难以乳化完全。因此制备好的乳化剂要经过鉴定才能使用。鉴定方法是将乳化剂逐滴滴入冷水中，若乳化剂成滴状浮于水面，保持完整不分散即为乳化完全，为合格的油包水剂。

此外，生物佐剂的应用也越来越广泛，采用细胞因子如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和热激蛋白等，这些佐剂的特点是可以增强细胞免疫应答，从而应用于以刺激细胞免疫应答为目的的肿瘤和感染性疾病的治疗性疫苗的研制。

二、人工合成多肽抗原的制备原理和应用

抗原具有特异性，而决定其特异性的基本结构或化学基团就是表位（epitope)，或者称为抗原决定基（antigenic determinant)。表位一般是由5～15个氨基酸残基构成的。因此采用化学方法用氨基酸合成表位多肽，可以作为人工合成多肽抗原，用于刺激机体产生相应的免疫应答。近年来，随着生物信息学技术的发展，对T细胞和B细胞表位的预测分析，使得人工合成多肽抗原在免疫学的研究中受到广泛重视。

（一）多肽抗原的预测、分析、设计

在已知抗原蛋白序列的情况下，如何选择免疫原性较强的多肽片段合成抗原多肽，是获得针对抗原的特异性抗体的关键因素。通常采用Kyte和Doolittle（1982）创立的疏水指数学说以及Chou和Fasman（1974）创立的β转角二级结构的预测方法（表6-1)，通过计算机辅助选择合适的抗原肽链序列，这些方法可以选择出蛋白质抗原表面的线性表位结构。

表 6-1　氨基酸的疏水指数和 β 转角指数

氨基酸	代码	疏水指数[a]	β 转角倾向指数[b]
精氨酸	Arg (R)	−4.5	0.95
赖氨酸	Lys (K)	−3.9	1.01
天冬氨酸	Asp (D)	−3.5	1.46
谷氨酸	Glu (E)	−3.5	0.74
天冬酰胺	Asn (N)	−3.5	1.56
谷氨酰胺	Gln (Q)	−3.5	0.98
组氨酸	His (H)	−3.2	0.95
脯氨酸	Pro (P)	−1.6	1.52
酪氨酸	Tyr (Y)	−1.3	1.14
色氨酸	Trp (W)	−0.9	0.96
丝氨酸	Ser (S)	−0.8	1.43
苏氨酸	Thr (T)	−0.7	0.96
甘氨酸	Gly (G)	−0.4	1.56
丙氨酸	Ala (A)	1.8	0.66
甲硫氨酸	Met (M)	1.9	0.6
半胱氨酸	Cys (C)	2.5	1.19
苯丙氨酸	Phe (F)	2.8	0.6
亮氨酸	Lue (L)	3.8	0.59
缬氨酸	Val (V)	4.2	0.5
异亮氨酸	Ile (I)	4.5	0.47

a. Keyte 和 Dolittle (1982); b. Chou 和 Fasman (1974)。

1. 多肽抗原表位的设计方法一

选取合适格式的蛋白质序列，通过计算机软件已选定算法去分析，如 GCG (genetics computer group) 或者通过网站 ProPASy (ExPASy; http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl)。①选定相应的参数，计算蛋白质序列的疏水指数和 β 转角的趋向。Windows size 设为 7 或 9，且每个氨基酸权重相同，并将结果用图形或数字的形式，或者以二者兼之的形式保存起来。②比较得到的两种算法的结果，并在序列中寻找转角趋势较高的和亲水性较高的（疏水性低）区域。③检查具有糖基化位点的序列，如 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 等与糖基连接的氨基酸基序。也可以使用 NetOGlyc (ExPASy) 来预测哺乳动物蛋白质的粘蛋白-GalNAc O 型的糖基化位点。因为糖基可能妨碍氨基酸与抗体的结合，除非已知这种抗原的蛋白质没有被糖基化，尽量在选择多肽序列时排除任何含有糖基化位点的序列。④挑选合适的序列合成抗原肽的原则是，这个序列的转角趋势应具有最大的阳性值（阳性偏离）且在相应位置的疏水性具有最大的阴性值（阴性偏离）。此外，抗原肽的亲水区域与氨基或者羧基末端相连，这样它们往往暴露于表面以利于溶解。另外，最好选择一段带电荷的氨基酸残基的序列，如包含 Arg、Lys、His、Glu 和 Asp 残基的序列，这些氨基酸被定位于蛋白质的表面，可以使合成肽的溶解性得以提高。

2. 多肽抗原表位的设计方法二

虽然可以利用计算机分析，但肽序列的挑选也可以通过人工筛查的方法来完成。

1）首先观察蛋白质的氨基酸序列，并且从10～15个氨基酸残基的片段中挑出至少包含2或3个带电荷残基（Lys、Arg、His、Asp、Glu）的区域。如果不能找到符合这个标准的区域，就选择含有带电氨基酸残基数目最多的序列。

2）从序列中选出Ser、Thr、Asn、Gln、Pro和Tyr含量高的子序列。

3）利用表6-1提供的数值，设定参数Windows size为9，计算选择的序列中的每一个氨基酸的平均亲水值和转角倾向值。确定计算选定序列尾部残基的值包括侧链残基在内。

4）给选定序列中每个氨基酸的值绘图，找出亲水性值和相应的转角倾向值指数是最优值的序列，这些序列都是抗原肽序列的备选。

5）去除备选序列中含有糖基化基序的序列，如Asn-X-Ser和Asn-X-Thr，以免这些基序能连接上糖链。

6）挑选其中最合适的序列［见方法一，步骤4)］。

（二）人工合成多肽抗原的偶联

人工多肽一般需要和蛋白质载体偶联，形成全抗原，才能刺激机体产生免疫应答。在与载体偶联之前，与蛋白质载体相连的肽链中的末端残基需要通过乙酰化或酰胺化修饰，以维持它们天然的状态。修饰能降低肽的极性并对肽链的溶解性有重要的影响。

1. 原理

按上述方法选择一条10～15个氨基酸的序列，并通过肽链合成设备合成这条肽。如果这条序列不含有半胱氨酸残基，可以在它的氨基端或者羧基端加上一个半胱氨酸，通过它再利用MBS（m-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester）使肽链与载体蛋白相连。如果这条序列的末端含有一个半胱氨酸残基，可以选择利用戊二醛法作为偶联方法。

2. 使用双功能团试剂将合成肽偶联至载体蛋白

钥孔戚血蓝素（KLH）能够被MBS激活，也可以直接购买被KLH激活的MBS（Piece，Boehringer Mannhein）。硫代-m-苯甲酰马来酰亚胺-*N*-羟基琥珀酰亚胺酯（硫代-MBS，MBS的水溶性的替代物）、氯化琥珀胆碱-4-（*N*-马来酰亚胺-甲基）-环己烷-1-羧酸盐酯（SMCC）和它的硫酸化的类似物，含有一个对pH稳定的马来酰亚胺的硫代-SMCC，可作为MBS的替代物。这些硫代试剂能够溶解于水，而其他种类只能溶解在有机溶剂中。

材料与试剂

钥孔虫戚血蓝素（KLH；Pierce，Sigma，Calbionchem或Boehringer Mannheim）

0.01mol/L磷酸缓冲液，pH7.5

MBS/DMF溶液：10mg/ml MBS（Pierce）溶于新鲜的*N*，*N*-二甲基甲酰胺（DMF）

0.05mol/L和0.01mol/L磷酸钠盐缓冲液，pH7.0

合成N端或者C端半胱氨酸数目减少的肽链

6mol/L盐酸胍盐

平底管型玻璃瓶

0.9cm×15cm 的凝胶过滤柱

G-25 或 G-50 的葡萄糖凝胶（Amersham Bioscience）或者 P2 或 P4 树脂生物凝胶（Bio-Rad）；或者预先填充好的 PD-10 层析柱（Amersham Bioscience）

步骤

1）将 5mg KLH 溶解在 0.5ml 的 0.01mol/L pH7.5 磷酸缓冲液中，置于小的平底管型玻璃瓶中。

2）添加 100μl MBS/DMF 溶液，室温下在微型摇床上轻摇 30min。虽然允许有少量的沉淀物，但如果沉淀物较大，将整个步骤重复一次。

3）使用 0.9cm×15cm 的凝胶过滤柱分离游离的和被 MBS 激活的 KLH，再用 0.05mol/L pH7.0 磷酸缓冲液均衡洗脱凝胶。收集每 0.5ml 的洗脱液并测定 280nm 处的光吸收值。

4）保留包含第一峰值的洗脱液（KLH-MBS 轭合物），丢掉包含第二个峰值的洗脱液（未与 MBS 偶联）。集中近似混浊的 KLH-MBS 偶联的成分。

5）将 5mg 的合成肽溶解在 0.01mol/L pH7.0 磷酸缓冲液中，立刻使用。若肽的溶解性较低，加入适量 6mol/L 的盐酸胍盐。

6）将肽溶解液加入 KLH-MBS 偶联溶液中。室温中用微型摇床轻摇 3h 或过夜。

7）在 4℃下对 4L 蒸馏水透析。在 24h 内用作免疫源。

8）若肽链中包含 Cys、Tyr、Lys 或 His 残基，不能使用以上方案。不得对初始的氨基基团使用 Tris 或其他缓冲液。

（万　涛）

参考文献

沈关心，周汝麟．2002．现代免疫学实验技术．武汉：湖北科学技术出版社．1～6．

辛普森 R J．2004．蛋白质纯化实验指南——用于蛋白组学研究．北京：科学出版社．121～179．

赵永芳．2002．生物化学技术原理及应用．北京：科学出版社．100～123．

Barth HG，Barth HG，Boyes BE，et al. 1994. Size exclusion chromatography. Anal Chem，66（12）：595R～620R.

Burgess RR，Thompson NE. 2002. Advances in gentle immunoaffinity chromatography. Curr Opin Biotechnol，13（4）：304～308.

科利根 JE，比勒 BE，马古利斯 DH，等．2009．精编免疫学实验指南．曹雪涛，于益芝，孙卫民，等译．北京：科学出版社．468～471．

Mallik R，Hage DS. 2006. Affinity monolith chromatography. J Sep Sci，29（12）：1686～1704.

Pascal B，George KE，Wen-Jian Fung，et al. 2000. An Overview of Affinity Chromatography，Humana Press. ISBN 978-0-89603-694-9，ISBN 978-1-60327-261-2.

Peng HH，Wu S，Davis JJ，et al. 2006. A rapid and efficient method for purification of recombinant adenovirus with arginine-glycine-aspartic acid-modified fibers. Anal Biochem，354（1）：140～147.

Tancevski I，Wehinger A，Patsch JR，et al. 2006. *In vivo* application of adenoviral vectors purified by a Taqman Real Time PCR-supported chromatographic protocol. Int J Biol Macromol，39（1-3）：77～82.

Wilchek M，Miron T. 1999. "Thirty years of affinity chromatography". Reactive and Functional Polymers，41：263～268.

第七章　抗　　体

第一节　概　　述

抗体在疾病诊断和免疫防治中发挥重要作用，人工制备的抗体按照生产技术可以分为多克隆抗体（polyclonal antibody）、单克隆抗体（monoclonal antibody，McAb）和基因工程抗体（genetic engineering antibody）。

通过抗原免疫动物，获得抗血清，经初步纯化后获得的抗体，为多克隆抗体，由于操作简单，获取容易，为广大科研人员广泛使用。由于天然抗原常含多种不同抗原表位，故所获得的抗体是含多种抗体的混合物，均一性和特异性比单克隆抗体差，抗体效价偏低。

单克隆抗体技术是由德国科学家 Kohler 和 Milstein 于 1975 年建立的，将免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合，获得的杂交瘤细胞，该细胞即保留了骨髓瘤细胞的永生化特性，又保留了 B 淋巴细胞分泌特异性抗体的能力，通过有限稀释对杂交瘤细胞单克隆化，可制备出针对单一表位的高特异性、高均一性的单克隆抗体，是第二代抗体生产技术。

单克隆抗体问世后，在生命科学理论研究和临床实践中得到了极为广泛的应用，尤其是在疾病诊断方面得到广泛应用，在疾病治疗方面虽然也取得了一定的效果，但是，由于所获单克隆抗体为鼠源性，人体应用后可导致人抗鼠抗体（human anti-mouse antibody，HAMA）产生，从而多次应用后会使效应下降和产生严重的过敏反应。另外，其在体内的半衰期短，其介导的抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用（antibody dependent cell-mediated cytotoxicity，ADCC）和补体依赖的细胞毒作用（complement dependent cytotoxicity，CDC）效应弱，使其体内的应用受到严重限制。随 DNA 重组技术发展，通过基因工程方法尽可能去除抗体中鼠源部分，以人抗体代替鼠源部分，即为基因工程抗体，是目前抗体研究中最热点的内容，目前临床上使用的抗体基本上都属于基因工程抗体。基因工程抗体也称为第三代抗体，先后出现了部分或全人源化的抗体，20 世纪 80 年代初期发展到现在，单克隆抗体人源化经历了恒定区人源化［人-鼠嵌合抗体（chimeric antibody）］、可变区人源化［CDR 移植抗体（CDR graft antibody）］，直至利用抗体库技术获得完全人源性抗体。

本章主要介绍多克隆抗体和单克隆抗体的制备、鉴定，基因工程抗体的人源化方法和策略，小分子抗体的构建以及抗体的纯化方法。

第二节　多克隆抗体的制备及鉴定

用抗原免疫动物可诱导免疫应答，B淋巴细胞经分化增殖后形成浆细胞，并分泌特异性抗体。抗体主要存在于血清中，从免疫动物获得的血清即抗血清或称免疫血清。此类抗血清是针对抗原物质上多种抗原决定簇的多克隆抗体，而且是免疫球蛋白不同种类、亚类及型别的混合体，所以其特异性不高，易发生交叉反应，均一性差，不易大量制备和纯化，实际应用受到限制。

尽管单克隆抗体和基因工程抗体的问世和发展已逐步代替了抗血清，但抗血清的制备过程相对较容易，其对抗原的亲和力一般较高，在诊断、防治疾病，以及实验研究中仍然大量应用。

抗原是免疫应答的激发剂，其性质如异物性、可溶性或颗粒性、分子大小和化学组成及结构等是决定能否获得特异性好、效价高的抗血清的关键因素，因此在免疫动物制备抗血清之前，必须获得良好的纯化抗原，并且备有足够量的抗原用于免疫动物。

选择合适的动物用于抗原免疫是影响抗血清制备的重要因素。需考虑抗原与动物种属的关系、动物对抗原的反应性、抗血清的需要量和用途等，同时应选择适龄、适当体重和无感染的正常动物。

根据抗原的性质，选用适当的佐剂，并使抗原液乳化完全，充分发挥佐剂的效用。

免疫动物前要制定合理的免疫方案，这是获得良好质量抗血清的重要环节，包括抗原用量、免疫途径、免疫次数和间隔时间等。免疫动物的过程中要及时采血样监测抗体的效价，根据抗体效价的变化决定加强免疫的时间和次数，以及收集抗血清的时间。

免疫动物的饲养过程，要符合国家有关动物使用和保护等的各项规定，随时观察记录动物的健康和营养状况是否良好，以及环境卫生（通风、温度、采光）是否符合要求等。

一、抗血清的制备

常用于制备抗血清的动物有兔、羊（绵羊或山羊）、豚鼠和马等，有时也可用鸡或鼠，现以最常用的家兔为例介绍如下。

（一）用抗原免疫家兔的方法

材料与试剂

家兔（2～3kg，健壮、无感染性疾患）
含1～2mg/ml纯化抗原的PBS溶液
完全弗氏佐剂（complete Freunds adjuvant，CFA）
不完全弗氏佐剂（incomplete Freunds adjuvant，IFA）
5ml试管
注射器

注射针头

兔固定台

100mm 玻璃平皿

步骤

1）取家兔，从静脉采血，收集血样于 5ml 试管中，置室温 1h 左右，待血液凝固形成血块，4℃下放置过夜使血清析出，将血清转移至离心管中，4℃下 2000r/min离心 10min，吸取上清作为未免疫的对照血清，贮存于－20℃待测。

2）用一注射器吸取 2ml 含 0.25～0.5mg/ml 纯化抗原的 PBS，另一注射器吸取等量 CFA，二者之间以塑料管连接，来回反复抽吸；或将 CFA 置研钵中，逐滴加入抗原液，边滴加边研磨。直至形成完全乳化的乳状液。

3）固定住动物，分别经肌内、皮内或皮下多部位给动物注射抗原乳状液，每点 0.1ml。

4）每隔 2～3 周进行加强免疫，按步骤 2）和 3）制备抗原，用 IFA 代替 CFA 作为免疫佐剂。

5）在第 2 次加强免疫后 2 周，从耳静脉采血 1ml，按步骤 1）分离血清，检测抗体效价。当抗体效价达到预期水平时，即可收集抗血清。

注意事项

1）抗原溶液必须与 CFA 或 IFA 完全乳化才有免疫效果。判定完全乳化的方法是：取一小滴乳状液，使其落到冰水表面，如果乳状液呈团状漂浮在冰水上不分散，则已完全乳化。如液滴分散，继续混合乳化至完全乳化。

2）免疫部位至少有 10 个以上。

3）通常经初次免疫和 2 次加强免疫后，抗体效价达可到预期水平。如未达到预期效价，需再进行加强免疫，直到达到预期效价（双向免疫扩散试验效价＞1∶32 或 ELISA 效价＞1∶1000）。

4）通常一次同时免疫多只家兔，选取免疫效果最好的收集抗血清。

（二）抗血清的收集

根据免疫动物的种类不同，采用相应的抗血清收集方法。家兔是最常用的免疫动物，因此以兔抗血清的收集为例进行介绍。采集兔血的方法主要有 3 种，耳缘静脉或耳动脉采血、颈动脉放血和心脏取血。如需反复多次采血可用耳缘静脉或耳动脉采血。采血时请注意无菌操作。

材料与试剂

已免疫的家兔

固定装置

手术器械

玻璃平皿

离心管

步骤

1）耳缘静脉或耳动脉采血：用手拉住并固定兔耳，以手术刀片快速切开耳缘静脉或耳动脉，立即用试管接血；也可直接用注射器从耳缘静脉或耳动脉抽血。

2）颈动脉放血：将兔固定于兔台，使之仰卧，剪去颈部的毛，切开皮肤，分离暴露颈动脉，用止血钳夹住近心端，将后接塑料管的注射针头插入颈动脉，扎紧固定，松开止血钳放血。

3）心脏取血：将兔仰卧固定于兔台，用手触及兔左胸心跳最明显部位，插入注射器直接抽取血液。

4）收集的血液可放入玻璃平皿中，置室温下 1h 左右，待血液凝固后置 4℃过夜，将血清移入离心管中，4000r/min 离心 10min。收取血清，分装，贮存于－40℃以下，或冻干后保存于 4℃。

二、抗血清质量的检测

分离的抗血清必须经过质量鉴定，包括抗血清效价、特异性和亲和力鉴定。

（一）抗血清效价测定

双向免疫扩散试验（参见第二十四章）简单易行，常用于初步检测抗蛋白质类抗原的抗体效价。若采用酶联免疫吸附试验（ELISA，参见第十四章）和放射免疫测定（RIA，参见第十三章）进行测定则更加灵敏、准确、快速。用 ELISA 测定抗血清效价时，用纯化抗原包被 96 孔板，加系列稀释的抗血清，洗涤后再加酶标记的抗兔抗体（酶标二抗），最后加底物显色。

（二）抗血清特异性测定

抗体的特异性通常是以交叉反应率来表示。可采用 ELISA、放射免疫法等，以不同浓度的抗原与近似抗原的物质分别做竞争抑制曲线，计算各自的结合率，求出各自在 IC_{50} 时的浓度，按公式 $S=Y/Z\times100\%$ 计算交叉反应率。式中，S 为交叉反应率，Y 为 IC_{50} 时抗原浓度，Z 为 IC_{50} 时近似抗原物质的浓度。特异性好的抗血清交叉反应率低，而特异性差的抗血清则交叉反应率高。

（三）抗血清亲和力测定

抗体亲和力（affinity）是指抗体与相应抗原结合的紧密程度，是评价抗体性质的最重要的指标之一。亲和力的高低一般以结合常数（K_a）或解离常数（K_d）表示，K_a 的单位是 L/mol，K_d 的单位是 mol/L，两者互为倒数。K_a 值越大，表示抗体的亲和力越高；相反，K_d 值越大，则表示抗体的亲和力越低。放射免疫法是经典的测定方法，但 ELISA 更加方便，无放射污染，且灵敏度高，是目前常采用的方法。

第三节　单克隆抗体的制备及鉴定

Kohler 和 Milstein 于 1975 年成功地将经绵羊红细胞免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓

瘤细胞融合，形成杂交瘤细胞，运用HAT选择性培养基进行培养，使杂交瘤细胞成为该培养基中唯一存活的细胞，再经过多次克隆化，筛选出持续分泌特异性抗体并可长期传代的杂交瘤细胞克隆。由于这种杂交瘤细胞克隆是由一个产生抗体的B淋巴细胞与一个骨髓瘤细胞融合经无性繁殖产生的细胞群，所以其分泌的抗体都是针对某一抗原决定簇的，特异性强，且具有相同的免疫球蛋白类型和亲和力，故称为单克隆抗体(McAb)，简称为单抗。HAT培养基含次黄嘌呤（hypoxanthine，H）、氨基蝶呤(aminopterin，A)、胸腺嘧啶脱氧核苷（thymidine，T)。其具有选择性的原理是，叶酸拮抗剂A能阻断细胞利用H和T正常合成DNA的代谢途径，在此种情况下，细胞可通过次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核苷转移酶（HGPRT）及胸腺嘧啶核苷激酶（TK）经代谢旁路利用H和T合成核酸而得以生存，但用于制备杂交瘤细胞的骨髓瘤细胞是由8-氮杂鸟嘌呤（8-azaguanine，8-Az）或5′-溴脱氧尿嘧啶核苷诱导突变，缺失HGPRT或TK两种酶，不能经代谢旁路合成核酸而死亡，B淋巴细胞虽然能合成核酸，但在体外不能长期存活，因此，在HAT培养基中，只有B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合的杂交瘤细胞可依靠B细胞提供的HGPRT或TK，利用H和T合成核酸而存活。自身融合的B细胞或骨髓瘤细胞均不能存活。

常用的小鼠骨髓瘤细胞株来源于BALB/c小鼠，有SP2/0-Ag14、X63-Ag8-653、FO、NS-1等，所以免疫B细胞的来源也应为BALB/c小鼠。这些细胞在长期培养后会发生回复突变。可以用8-氮杂鸟嘌呤或6-硫代鸟嘌呤（6-TG）进行有限稀释复选。用含20～30μg/ml 8-Az或2×10^{-5}mol/L 6-TG的细胞培养液培养细胞，存活的细胞即为HGPRT缺陷细胞，扩增后冻存。现也有大鼠的HGPRT缺陷骨髓瘤细胞株，用于准备大鼠抗小鼠抗原的McAb。

20世纪80年代以来，McAb在生物医学领域的基础研究以及临床疾病的诊断和防治中发挥了巨大作用，Kohler和Milstein因此获得了诺贝尔生理学或医学奖。但是，由于McAb一般都是来源于小鼠或大鼠，在用于人体进行预防和治疗疾病时能诱导产生人抗鼠源McAb的抗体（HAMA)，降低了McAb的效用，其在人体的实际应用受到了限制。而人源杂交瘤的制备较为困难，且稳定性差，抗体产量较少。此外，由于完整的大分子抗体缺乏良好的组织穿透性，并且较难获得所需特异性的免疫球蛋白的特定亚类，抗体恒定区的其他功能得不到充分利用。因此，目前已着力研制基因工程抗体，克服McAb的不足之处，以期在防治人类疾病中发挥更大的作用。

材料与试剂

靶抗原：颗粒性抗原（细胞）或可溶性抗原（蛋白质或多肽）

PBS

BALB/c小鼠（无病原体感染，6～8周龄）

CFA

IFA

SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞系

RPMI-1640或DMEM培养液

小牛血清

不完全培养液：RPMI-1640 或 DMEM/10mmol/L HEPES/1mmol/L 丙酮酸钠

完全培养液：含 10%小牛血清的 RPMI-1640 或 DMEM/10mmol/L HEPES/1mmol/L 丙酮酸钠

Tris-NH_4Cl：0.02mol/L Tris-Cl，pH7.2/ 0.14mol/L NH_4Cl

50%聚乙二醇（PEG，M_r 4000）

HAT 或 HT 选择培养液：含 20%小牛血清的 RPMI-1640 或 DMEM/ 10mmol/L HEPES/ 1mmol/L 丙酮酸钠/1×HAT 或 1×HT（100×HAT 或 HT 包装，Sigma 产品）

二甲基亚砜（DMSO）

2ml 注射器和注射针头

100ml 烧杯

175cm^2 组织培养用细颈瓶

1ml 和 10ml 吸管

倒置显微镜

CO_2 细胞培养箱

60mm 有盖培养皿

尖头镊或眼科剪

150 目不锈钢或尼龙细网筛

血细胞计数板

50ml 塑料锥形离心管

96 孔平底细胞培养板

步骤

1. 小鼠免疫接种

一般使用 BALB/c 小鼠，也可用大鼠或仓鼠。现以常用的小鼠免疫为例。

1）准备 1～50μg 蛋白质或多肽抗原或 2×10^7～5×10^7 个细胞性抗原。

2）初次用蛋白质或多肽抗原免疫，取抗原液加等量的 CFA，用两个注射器（通过一细塑料管连接）来回抽吸，或用研钵研磨，使之成为油包水的完全乳化的乳状液（详见本章“抗血清制备”）。

3）细胞性抗原在接种前用 PBS 洗 3 次，配成 2×10^7～5×10^7 个/ml 细胞悬液，无需加 CFA。

4）将乳状液或将细胞悬液移入一个 1ml 或 2ml 注射器，安装注射针头并拧紧。

5）按照免疫方案进行免疫接种。可溶性抗原通常经多点皮下免疫接种，每点 0.1ml，每只小鼠共 0.8～1ml。细胞性抗原经腹腔免疫，每只小鼠 1×10^7～2×10^7个细胞，共 0.5～0.8ml。

6）免疫后 2～3 周，用与初次免疫剂量相同的可溶性抗原加 IFA 制成乳状液，经皮下 2 次免疫动物。或用与初次免疫相同的细胞量，经腹腔加强免疫。

7）如果需要，可于 2 次免疫后的 7～10d 取少量血清，使用 ELISA（参见第十四

章）或免疫沉淀法（参见第二十四章）测定抗体效价。视效价测定结果，决定是否需要进行加强免疫。

8）最后一次加强免疫 2～3 周后，在细胞融合实验前 3d 再次加强免疫：可溶性抗原不加 IFA，直接用 50～500μg 抗原溶液静脉注射，或用同上量细胞进行腹腔或静脉注射。

2. 细胞融合

用于细胞融合的骨髓瘤细胞应与免疫动物属同一品系。目前已有多种可用于融合的骨髓瘤细胞系，以常用的 SP2/0 细胞为例，其培养液可用 RPMI-1640、DMEM 等，含 10%的小牛血清，细胞浓度为 10^4～5×10^5 个/ml 较合适，最大浓度不超过 10^6 个/ml。当细胞处于对数生长期时，按 1∶3～1∶5 的比例传代，每 3～4 天传代一次。单个或分散的少量杂交瘤细胞不易生长繁殖，若加入饲养细胞可促进这些细胞生长繁殖，最常用的饲养细胞，一般选用与免疫小鼠相同品系的腹腔巨噬细胞。

1）骨髓瘤细胞的制备：细胞融合前用无血清培养液洗涤细胞 2 次，计数，至少预备 10^7 个细胞。

2）饲养细胞的制备：按第一章的方法制备小鼠腹腔巨噬细胞，通常在细胞融合前 1d 或前 2h 接种于 96 孔细胞培养板，每孔 2×10^4 个或 10^5 个细胞/100μl HAT 选择培养液。

3）脾脏细胞的制备：最后一次加强免疫后 3d，无菌取出小鼠脾脏（参见第二章），用无血清培养液制备成单细胞悬液，每个免疫小鼠脾脏大约含有 10^8 个淋巴细胞。

4）细胞融合时，将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1∶10 或 1∶5 的比例混合于 50ml 离心管中，1200r/min 离心 8min，弃上清，尽量吸净残留液体，轻轻地弹击离心管底，松动沉淀的细胞。置于 37℃水浴中预温。

5）取 37℃预温的 50%PEG 溶液 1ml，于 1min 内匀速逐滴加到细胞中，边加边轻微摇动离心管。

6）置 37℃水浴中作用 1min。

7）用 37℃预温的不完全培养液终止 PEG 作用：1min 内匀速滴加 1ml，再于 1min 内匀速滴加 2ml，此后 2～3min 内匀速滴加 7ml。边加边轻微摇动离心管。

8）800r/min 离心 5min，弃上清，轻轻地弹击离心管底，松动沉淀的细胞，重悬于 HAT 选择培养液。

9）将上述细胞悬液加到已有饲养细胞层的 96 孔板内，每孔 100μl，一般 1 个免疫小鼠的脾脏接种 4 块 96 孔板，培养于 CO_2 培养箱中。

3. 杂交瘤细胞的选择及抗体检测

在 HAT 选择培养液中，只有脾淋巴细胞和骨髓瘤细胞形成的杂交瘤细胞能存活，一般 HAT 选择培养液培养 5～7d 后应换用 HT 培养液，再维持 2 周，可改用一般培养液，此过程中每 2～3 天半量更换培养液，在倒置显微镜下观察细胞生长情况，当杂交瘤细胞布满孔底 1/10 面积时，通常是 10～12d，取上清检测特异性抗体。

检测各孔分泌的特异性抗体的方法一般以快速、简便、特异、敏感为原则，并考虑抗原的性质和抗体的类型不同，选择不同的筛选方法。最常用的方法是 ELISA（参见第十四章），此外也可用放射免疫测定（参见第十三章）、免疫荧光检测（参见第十五章）及细胞毒性试验（参见第二十四章）等。

4. 杂交瘤的有限稀释法克隆化

HAT 筛选后的杂交瘤细胞并非一个孔内只有一个克隆，即便是抗体阳性孔中的杂交瘤细胞也可能有数个克隆，包括抗体分泌细胞和抗体非分泌细胞。所以必须尽早对抗体阳性的杂交瘤细胞进行克隆化，得到真正的单克隆抗体分泌细胞。最常用的克隆化方法是有限稀释法。

1）预先制备饲养细胞（方法同细胞融合前准备）。

2）将抗体阳性孔内的细胞吸出，计数，用完全培养液调细胞数至 1×10^3～5×10^3 个/ml，再用完全培养液将细胞浓度稀释为 100 个/ml、50 个/ml、20 个/ml、10 个/ml、5 个/ml。初次克隆化时需用含 HT 的完全培养液。

3）100 个/ml、50 个/ml 两个浓度细胞分别加到 96 孔板的 1、2 和 3、4 两列孔中，20 个/ml、10 个/ml、5 个/ml 3 个浓度细胞分别各加到 3 列孔中，100μl/孔。

4）培养 4～5d 时，倒置显微镜下可见细胞克隆生长，半量换液，8～9d 时待细胞克隆长到适当大小时及时进行抗体检测。

5）对抗体阳性且为单克隆生长的细胞进行再克隆化，同时移种至含饲养细胞的 24 孔板中扩大培养。

5. 杂交瘤的冻存和复苏

由于在培养杂交瘤细胞的过程中随时可能发生细胞的污染或丧失分泌抗体能力等情况，必须及时冻存原始孔的杂交瘤细胞和每次克隆化得到的亚克隆细胞，以免前功尽弃。杂交瘤细胞的冻存方法同其他细胞系的冻存和复苏方法基本相同。

1）配制细胞冻存液：50%小牛血清、40%不完全培养液和 10%二甲基亚砜（DMSO），事先预冷至 4℃。

2）收集细胞，离心弃上清，加入冻存液，分装于冻存管，动作要轻柔、迅速。

3）冻存时逐步降温，存入液氮中，可至数年或更长时间。

4）定期复苏冻存的杂交瘤细胞，复苏细胞时，将取自液氮的冻存管迅速放入 37℃水浴中，使冻存的细胞快速解冻，离心后弃上清，将细胞移入前一天已铺有饲养层细胞的培养瓶内，置 CO_2 孵箱中培养。

5）当细胞生长良好时，检查其活性和分泌抗体的稳定性。

6. McAb 的大量制备

大量制备 McAb 的方法主要分为体外法和体内法。

体外法：将杂交瘤细胞用无血清培养液体外培养，使其大量生长直至死亡，从上清中获取 McAb，但此方法得到的抗体量少。

体内法：目前最常用的方法是将杂交瘤细胞接种于同系小鼠腹腔，制备腹水或血清。

1）预先给小鼠腹腔内注射 0.5ml 降植烷或液体石蜡，1～2 周后将培养的杂交瘤细胞

用PBS洗3次，1000r/min离心10min，以1×10^6个细胞/0.5ml进行腹腔注射。

2）7～10d后可见产生腹水，用注射针头刺入腹腔，视腹水多少收集3～5ml。2000r/min离心10min，吸取上清，分装后冻存。

7. McAb的鉴定

建立了分泌特异性抗体的杂交瘤细胞系后，应对制备的McAb进行系统的鉴定，主要包括以下几项。

1）特异性：可用IFA、ELISA（参见第十三章、第十四章）。原则上是除了用免疫原（抗原）进行检测外，还需要用其他相似抗原进行交叉试验，如鉴定抗重组细胞因子的McAb时，要检测是否与表达菌株的蛋白质或其他相关细胞因子有交叉反应。

2）Ig类与亚类：一般用酶标或荧光素标记的抗鼠IgG或IgM即可检测出McAb的Ig类是IgG类还是IgM类。进一步用标准抗Ig亚类血清做ELISA或双向扩散试验来确定Ig亚类。

3）中和活性：对于抗病原体或毒素等的McAb可用动物或细胞的保护试验来鉴定其中和活性。对于功能性蛋白质抗原可用中和试验了解抗体是否具有中和蛋白质的功能。

4）亲和力：可用RIA或ELISA（参见第十三章、第十四章）竞争结合试验来鉴定McAb结合相应抗原的亲和力。

注意事项

1）根据抗原的性质，预先制定出适当的免疫方案，尽量达到好的免疫效果，是成功制备McAb的先决条件。

2）免疫接种时，避免过度的压力使针头与注射器分离，造成乳状液的喷溅。在拔出针头前转动针头以减少渗出。

3）小牛血清用前除了要经过支原体检测，还要进行筛选，可以取不同来源或批次的小牛血清分别配制成完全培养液，用有限稀释法将骨髓瘤细胞接种于96孔细胞培养板，筛选出能良好支持单克隆细胞生长的血清，用于细胞融合。

4）骨髓瘤细胞在传代过程中，应定期用8-氮鸟嘌呤进行处理，使细胞对HAT呈均一的敏感性。在进行细胞融合时，骨髓瘤细胞应处于良好的状态。

5）进行细胞融合后，离心弃上清，松动细胞沉淀时动作要轻，先用5ml左右含20%小牛血清的HAT选择培养液重悬，不能用吸管用力吹打，避免融合在一起的细胞散开。

6）在起初的3～4d选择培养期间最好不从培养箱中取出培养板观察细胞，避免对杂交瘤细胞生长造成不利的影响。

7）必须在细胞融合前建立稳定可靠的抗体筛选方法，避免由于方法不当贻误筛选抗体的时机。

8）在细胞融合前对PEG进行筛选，避免使用有毒性或融合效用不佳的PEG。

9）应尽早进行杂交瘤细胞的克隆化，将特异性抗体分泌细胞与其他非抗体分泌细

胞分开。因为抗体非分泌细胞的生长速度比抗体分泌细胞的生长速度快，会抑制抗体分泌细胞的生长，甚至造成抗体分泌细胞的丢失。对已经克隆化过的杂交瘤细胞也应定期进行再克隆，以防由于杂交瘤细胞的突变或染色体丢失，而丧失产生抗体的能力。

10）通常要对阳性克隆多次有限稀释筛选，因为杂交瘤细胞常会丢失染色体而失去产生抗体的能力。经至少3次有限稀释后，全部有克隆生长的孔均为阳性时，说明杂交瘤已经稳定。可扩大培养并及时冻存。对已经克隆化过的杂交瘤细胞也应定期进行再克隆。

11）有限稀释时多余的细胞可合并冻存，以备将来必要时再筛选。

12）沉淀的细胞可转种小鼠腹腔或冻存，复苏后也可转种小鼠腹腔，生成腹水。

13）继续饲养已被收集过腹水的小鼠，以后可反复收集腹水数次。如处死小鼠，可收集血液于1.5ml塑料管中，待凝固、血清析出后，将血清以2000r/min离心10min，吸取上清并冻存。

14）在全部涉及细胞培养过程中，要严格无菌操作，控制细菌、霉菌和支原体的污染。

第四节　基因工程抗体的人源化策略和方法

据统计，50%的患者在单次注射小鼠抗体后就可以产生针对小鼠抗体的HAMA反应，反复注射2或3次后，高达90%以上的患者可以产生HAMA反应（Shawler et al.，1985）。而且鼠源性抗体介导ADCC和CDC的能力弱，半衰期短。因此对这些鼠源性抗体进行人源化非常有必要，利用基因工程的方法尽可能地去除抗体中的鼠源部分，用尽可能多的人抗体部分代替鼠源部分，也就是对抗体人源化改造的目的。

抗体分子由两条相同的重链和两条相同的轻链构成，每条链均可分为可变区和恒定区，抗体特异性由重链和轻链的可变区构成的抗原结合部位（complementarity determining region，CDR）所决定，此部分也是抗体中氨基酸序列变动最大部分。重链和轻链可变区中各有3个CDR（CDR1、CDR2、CDR3）和4个框架区（framework region，FR），重链和轻链的CDR共同构成了抗原结合的位点，而FR则对抗原结合位点的形成起到了支撑作用。可变区基因中的CDR核苷酸序列因抗体而异，而骨架区则相对比较保守。

根据抗体结构的特点，对抗体的恒定区进行替换是最早进行的，将鼠单克隆抗体的轻、重链可变区基因插入含有人抗体恒定区的表达载体中，转化哺乳动物细胞表达出人鼠嵌合抗体。这种抗体分子中轻、重链的V区是鼠源的，而C区是人源的，因此整个抗体分子的近70%是人源的。而CDR移植抗体则较嵌合抗体更进一步，只将鼠源抗体可变区中的CDR部分移植到人抗体的相应部分，去除鼠源抗体可变区FR部分，整个抗体分子的鼠源部分小于5%，进一步提高了人源化的程度，目前临床上使用的大部分治疗性抗体为此类抗体。由于抗体库技术的发展和转基因小鼠的建立，自20世纪90年代开始了全人源性抗体的研究，相信在不久的将来，全人源性抗体将是抗体发展的潮流。

本章重点介绍目前常用的CDR移植抗体的人源化的策略和方法。

一、基因工程抗体的人源化及其高效表达

CDR移植抗体的工作最早由Jones Winter（1986）开展。其方法是将鼠源McAb的6个CDR的氨基酸序列插入到人Ig的框架区，替代人源抗体CDR，使人源抗体获得鼠源McAb的抗原结合特异性，同时减少其异源性，因其主要涉及CDR的“移植”，因此称为CDR移植抗体。CDR移植技术的理论依据是：①CDR是决定抗原结合位点的唯一结构，因而也是抗体特异性和亲和力的决定部位；②框架区能够接受外源CDR的植入。CDR移植不仅可以降低McAb的免疫原性，而且还可以把鼠源McAb与Ag结合的性质授予人抗体。CDR移植抗体中非人序列含量低（约5%），研究已证实其免疫原性大大减小，并且在人体内的血清半衰期延长。

然而，FR也影响CDR的空间构型，一个错配的FR残基就可能对抗原的结合产生巨大影响。Queen等（1989）指出，将CDR单独移植到人源抗体上往往导致CDR结构的改变，从而使其亲和力下降。因此在CDR移植时，有必要将影响CDR结构的FR残基也一并转移过来。但这同时又增加了鼠源序列的成分，致使免疫原性也加强。从治疗的角度考虑，最好是能够找到FR变化最小而抗原亲和力又很高的人抗体。目前采用分子模拟和计算机辅助技术，已能对抗体进行分子设计，测定哪些FR残基变化对抗原结合有益，在人源FR区引入鼠源FR区的某些关键残基，如配置得当，其亲和力可与原有小鼠抗体的亲和力相当。

目前，对CDR移植的人源化路线是，通过数据库检索、计算机分子模拟等寻找出有最大同源性的人抗体可变区模板，选择与鼠源单克隆抗体同源程度较高的人抗体FR作模板，这可使人源化抗体FR与亲代鼠源FR的残基错配数达到最小值，制备除CDR序列外结构几乎相同的治疗抗体。综合考虑表面残基、与CDR有相互作用或对空间结构有重要影响的FR残基，确定需要保留和改变的关键残基，尤其是确定FR上的那些对与抗体的亲和力有影响的残基，再通过模拟基因合成、表达来检测实际效果，进行必要的修正，从而获得高亲和力的治疗性抗体。由于有计算机辅助下的人源化技术，目前已构建出多种针对不同抗原的CDR移植抗体并应用于临床诊治，并取得了令人满意的效果（如用于治疗乳腺癌的Herceptin、治疗转移性结肠癌的Avastin等）。

但是要掌握计算机辅助下的人源化技术，需要掌握蛋白质结构的三维模型构建和基因工程技术。因此，目前又出现了许多其他人源化的方法，包括较CDR移植更精确的SDR（specificity determining residue）移植，其理论依据是CDR中并不是所有的残基都参与了抗原的结合，其中只有20%～30%的残基决定了抗原和抗体相互作用特性，此部分残基即为SDR，只移植SDR可以显著降低鼠源的成分，使得免疫原性进一步降低（Kashmiri et al.，2005）；基于人抗体和鼠抗体CDR之间的结构相似性选择人抗体的模板，而不是传统的基于FR结构同源性，这样更易于寻找合适的人抗体的模板；构建人抗体FR和鼠源CDR共表达的文库，从中筛选最适合于CDR的人抗体FR，相对传统的方法更直接，省去了人抗体的模板设计过程（Dall'Acquaa et al.，2005）。

嵌合抗体的构建过程相对简单，除了未进行可变区的人源化外，其他步骤同CDR

移植抗体的构建基本一致，因此下面重点阐述目前使用最多的计算机辅助下的CDR移植抗体的构建过程。

构建和表达CDR移植抗体的步骤主要有以下几条。

1）鼠源单克隆抗体的轻重链的可变区的克隆。

2）人源化单克隆抗体的设计。

3）人源化单克隆抗体表达载体的构建。

4）稳定表达人源化单克隆抗体的细胞株的构建。

5）人源化单克隆抗体的鉴定以及与鼠源抗体的比较包括特异性、亲和力、免疫效应等。

6）高水平表达细胞株的建立。

下面分别叙述具体的操作方法。

（一）鼠源单克隆抗体的轻重链的可变区的克隆

从分泌McAb的杂交瘤细胞中克隆免疫球蛋白（Ig）轻、重链可变区的常用方法有：RT-PCR法和5′-RACE（rapid amplication of cDNA end）法。RT-PCR法利用鼠源Ig可变区的特异性引物（gene special primer，GSP），取得成功的前提是GSP与待克隆的Ig之间有较好的一致性，否则，很可能克隆不到特定序列或者完整序列。由于可变区序列存在相当丰富的多样性，因此引物设计要针对可变区中的保守序列，5′端引物一般设计在可变区的引导序列，也有设计在可变区内的FR1处，而3′端一般设计在重链或者轻链的恒定区部分。各实验室设计的引物往往都有一定的差别，文献报道的序列很多，引物的设计不一定要与基因序列完全匹配，可以带有简并引物，以防造成PCR产物与原来基因序列上氨基酸的变异，下面叙述的引物序列仅是报道的引物的一部分。

而5′-RACE法的基本原理与RT-PCR法相似，但是较RT-PCR更方便，更简单，成功率更高，它一般和SMART（switching mechanism at 5′ end of the RNA transcript）技术结合起来使用。SMART技术原理是：逆转录酶大都具有末端转移酶活性，在由mRNA逆转录成cDNA的过程中，逆转录酶到达mRNA的5′端时碰到真核mRNA特有的“帽子结构”，即甲基化的G，自动在单链cDNA的3′端加上3个dC残基。在逆转录合成cDNA的反应中事先加入3′端带Oligo（dG）的SMART引物，退火后dC残基与含有SMART寡核苷酸序列Oligo（dG）通用接头引物配对，形成cDNA的延伸模板，逆转录酶会自动转换模板，以SMART引物作为延伸模板继续延伸cDNA单链直到引物的末端，这样得到的所有cDNA单链的一端有含Oligo（dT）的起始引物序列，另一端有已知的SMART引物序列，合成第二链后可以利用通用引物进行扩增。由于有5′帽子结构的mRNA才能利用这个反应得到能扩增的cDNA，因此扩增得到的cDNA就是全长cDNA。如果将3′端的引物由Oligo（dT）换成鼠源免疫球蛋白基因恒定区序列，则可以非常快速的克隆到完整的可变区的序列。目前已经有商业化的试剂盒可以满足此类需要如SMART RACE cDNA放大试剂盒（BD Biosciences），Gene Racer Kit（Invitrogen公司）。在做5′-RACE前，需要知道所克隆的单克隆抗体的轻、重链的

类别和亚类。目前也有商业化的试剂盒可以用于检测小鼠单克隆抗体的类和亚类，如 Iso-Strip Isotyping 测定试剂盒（Roche Applied Science）或者 Isotyping Cytometric Bead Array Kit（BD Biosciences）。知道了单克隆抗体的种类后，就可以设计针对小鼠重链 γ1、γ2a、γ2b 和 γ3 引物，或者设计一个对所有小鼠 γ 链都通用的引物，目前常用的小鼠 γ1、γ2a 和 γ2b 的通用引物为 5′-GCCAGTGGATAGACTGATGG-3′，常用的小鼠轻链 κ 链的引物为 5′-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3′。也有商业化的引物可以购买，如 Mouse Ig-Primer Set（Novagen）。

5′-RACE 法的操作可以参考试剂盒的说明书，下面简述以 RT-PCR 法克隆可变区。

材料与试剂

分泌 McAb 的杂交瘤细胞株
PBS
RNA 抽提试剂盒
cDNA 合成试剂盒
二乙基焦碳酸（DEPC）处理过的水
50U/μl RNA 酶抑制剂（RNasin；Promega）
10mmol/L 4 dNTP 溶于水的混合物
9.5U/μl 禽成髓性白血病病毒（AMV）逆转录酶（Promega），1/10 稀释于逆转录酶缓冲液
20μmol/L 针对小鼠的重链和轻链可变区的上、下游引物
2U/μl *Taq* DNA 聚合酶
1.25mmol/L 4 dNTP 溶于 TE：每种 dNTP 溶度为 1.25mmol/L 并溶于 TE 缓冲液中，pH7.5。分装成 1ml/支，在－20℃可以保存 1 年
10×PCR 扩增缓冲液
T 载体（Invitrogen）
1 Weiss U/μl T4 DNA 连接酶和 2×T4 DNA 连接酶缓冲液（GIBCO/BRL）
感受态 *E. coli* 细菌
用于筛选的加入适当抗生素的 LB 平板
PCR 仪

步骤

1）设计几对简并 PCR 引物，以下引物同时应用可以克隆大部分小鼠单克隆抗体可变区的序列（Coligen，2003）。

（1）小鼠 V_H5′端引物（针对重链可变区的引导序列）

1. 5′-CTCACCATGG[A/G]ATG[C/G]AGCTG[T/G]GT[C/A]AT[C/G]-3′
2. 5′-CTCACCATG[A/G]ACTTCGGG [T/C] TGAGCT[T/G]GGTTTT-3′
3. 5′-CTCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT-3′
4. 5′-CTCACCATGG(A/G)CAG(G/A)CTTAC(T/A)AT(C/T)(T/C)-3′

（2）小鼠 V_L5′端引物（针对轻链 κ 链可变区的引导序列）

1. 5′-CTCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3′

2. 5′-CTCACCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG-3′

3. 5′-CTCACCATGGAG[A/T]CACA[G/T][A/T]CTCAGGTCTTT-3′

4. 5′-CTCACCATG[G/T]CCCC[A/T][A/G]CTCAG[C/T]T[C/T]CT[T/G]-3′

5. 5′-CTCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG-3′

6. 5′-ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCC-3′

(3) 小鼠 V_H3′端引物（针对重链恒定区）

1. 5′-GTTTTGGCTG[A/C][A/G]GAGAC[A/G/T]GTGA-3′

2. 5′-A(C/T)CTCCACACACAGG(A/G)(A/G)CCAGTGGATAGAC-3′

(4) 小鼠 V_L3′端引物（针对轻链 κ 链恒定区）

1. 5′-AGCCCGTTT [G/T] ATTTCCA [A/G] CTT-3′

2. 5′-ACTGGATGGTGGGAGATGGA-3′

2) 体外培养杂交瘤细胞至密度为 5×10^5 个/ml，室温下 1000*g* 离心 10min，收集细胞总量在 10^7 个以上，弃上清，将细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 遍，离心收集沉淀。

3) 按照 RNA 抽提试剂盒说明书抽提细胞 mRNA，将 mRNA 溶解在 20μl DEPC 处理过的水中。

4) 用 OD_{260} 和 OD_{280} 测定 RNA 的含量和纯度，$OD_{260}=1$ 时 RNA 的浓度为 40μg/ml，OD_{260}/OD_{280} 为 1.8～1.9 时，RNA 纯度合格。

5) 按照 cDNA 第一链合成试剂盒的说明由 mRNA 逆转录合成单链 cDNA。

6) 用上述合成的 cDNA 在 0.5ml 离心管中进行 PCR 扩增。以 100μl 反应体积为例，按顺序加入下列成分：1μl 小鼠轻链或重链可变区的 5′端混合引物、1μl 小鼠轻链或重链可变区的 3′端混合引物、2μl 2U/μl *Taq* DNA 聚合酶、16μl 1.25mmol/L 溶于 TE 中的 4 种 dNTP 混合溶液、10μl 10×PCR 扩增缓冲液，补无菌水至终体积 100μl。

7) 在 PCR 仪中扩增，程序：

30 个循环	60s	94℃（变性）
	60s	55℃（退火）
	60s	72℃（延伸）
1 个循环	10min	72℃（延伸）

8) 将 10μl PCR 产物在 1.5%～2%的琼脂糖胶凝上电泳，观察 PCR 产物的片段大小同预计的是否一致，使用引导区和恒定区的引物扩增的轻链可变区产物大小约为 380bp，重链可变区约为 420bp。

9) 将 PCR 产物克隆到 T 载体。

在 0.5ml 的离心管中进行连接反应（总体积在 20μl），包含：3μl PCR 产物、50ng T 载体、10μl 2×T4 DNA 连接酶缓冲液、1μl 1U/μl T4 DNA 连接酶，加水至 19μl。

10）转化感受态大肠杆菌。

11）通过小量碱裂解法制备 DNA，用合适的限制性内切核酸酶消化 DNA，在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳，证明插入片段大小正确。

12）对 PCR 产物测序。

注意事项

1）在 mRNA 逆转录成 cDNA 过程中，所有接触 RNA 的器械、容器、水和盐溶液都需要用 DEPC 处理并高压灭菌，在实验过程中要一直戴手套。

2）所示的引物中未引入酶切位点，根据载体情况自行设计。

3）由于 PCR 过程中经常发生核苷酸序列的替换，因此要多测定几个克隆，以获得正确的可变区序列。

4）杂交瘤细胞经常转录两种轻链 mRNA，一种是有功能的 mRNA，另一种是无功能的 mRNA，无功能的 mRNA 往往是 CDR3 处或附近的序列发生突变所致。因此，在克隆过程中，要测定数十个以上的克隆序列，保证所克隆的序列是有功能的。

5）RT-PCR 法可能克隆到不止一个 V_H 或 V_L 的序列，因此有必要对每一个序列进行确认，验证所测得序列是正确的，可以通过构建嵌合抗体检测其亲和力与鼠源抗体差异情况或者是通过对所分泌的抗体蛋白进行 N 端测序，氨基酸测序一般测定 15～20 个氨基酸，足以验证所获得的序列是否正确。

6）只有证实了克隆的可变区序列具有等同于鼠源抗体的亲和力，才能继续对其进行人源化设计和改造。

（二）人源化单克隆抗体的设计

将鼠源单克隆抗体中 CDR 部分直接替换人抗体的 CDR 部分，往往会丧失其抗原特异性结合力或者是其亲和力大大降低，这是因为可变区中 FR 部分残基对于维持 CDR 的高级结构或者对于保证 V_H 和 V_κ 之间的相互作用起到重要的作用，从而影响 CDR 的免疫反应性。因此，成功的 CDR 移植第一步是建立一个可变区的三维结构图，需要通过经验或者计算机模拟的方法寻找 FR 中对于 CDR 结构有重要影响的残基。第二步是将克隆到的鼠源单克隆抗体可变区中 FR 部分在人抗体基因库中进行同源性比较，筛选出同源性最高的 FR 序列。第三步就是具体设计人源化可变区（Qu et al.，2005）。

1. 构建鼠源抗体的可变区三维结构图

构建可变区的三维结构图可以参照 ABMOD 和 ENCAD 模式（Levy et al.，1989；Zilber et al.，1990）进行设计，还可以用 AMBER 软件或者一些常用的网址建立三维结构图，如 3D-JIG-SAW 软件（http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw）和 SWISS-MODEL（http://www.expasy.org/ swissmod/）。用 ABMOD 和 ENCAD 模式构建可变区的三维结构图的基本过程如下。

1）将抗体的重链和轻链可变区序列各分成 14 个有结构意义的片段。

2）将这些片段按照 ABMOD 和 ENCAD 方法或者 CLUSTALW（Thompson et

al.，1994；Higgins et al.，1996）方法同PDB数据库中已有的抗体序列进行多次匹配，筛选出同每个片段有最高同源性的序列。

3）按照已知的结构拼凑出完整的可变区结构图。

4）结构图的进一步优化。按照以上方法拼凑出的结构图，可能并不是最优化的，因此还需要进一步优化，主要是考虑其结构的稳定性，可用ENCAD软件将三维结构内的能量削减到最小。

2. 挑选最适合鼠源CDR序列的人源的FR

Kabat（1991）数据库是目前使用最多的抗体数据库，包含有人、小鼠和大鼠等9个物种的免疫球蛋白基因序列的信息。尽管GenBank中包含的抗体数量比Kabat数据库多，但是Kabat数据库中抗体的序列已经足够进行同源性比较。同源性比较的目的是尽量选择与鼠源FR一致性高的人抗体可变区的FR，可以用BLAST方法进行同源性比较，所选的人源FR与鼠源FR的一致性最好在65%以上。目前使用最多的人抗体的FR为Kabat数据库中的EU（人 V_H 亚群Ⅰ）、NEWM（人 V_H 亚群Ⅱ）、KOL（人 V_H 亚群Ⅲ）和REI（人 V_κ 亚群Ⅰ）。另外，还有其他数据库可以供寻找同源性的人免疫球蛋白的FR，如GenBank（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）、EMBL（http://www.ebi.ac.uk/embl）、SWISS-PROT（http://www.expasy.ch/sprot/和http://www.ebi.ac.uk/swissprot/）和PIR(http://pir.georgetown.edu/)。

注意事项

1）一个FR中的氨基酸序列可能来自于不同的人源抗体，包含稀有的FR序列，可以使用通用的FR序列替换所选人源抗体中含有比较稀有的FR序列。

2）CDR序列的确定按照Kabat等（1991）确立的方法进行确认。

3）如果使用的人源抗体序列不是来自于按照氨基酸序列推算的或者是cDNA来源的序列，而是来源于胚胎基因（germline gene）序列的，需要注意其序列的染色体定位，只有定位于14号染色体的序列方可使用，避免采用来源于15号和16号染色体的序列，因为15号和16号染色体来源的序列并不参与抗体基因的重排。

3. 具体设计人源化抗体

选定对CDR结构起重要作用的关键FR残基

直接影响抗原结合位点的构象或者直接同抗原接触的FR中的残基称为FR的关键残基。按照Queen等（1989）的方法，在空间构象上，与CDR残基之间的距离为4～6Å的FR残基最有可能是关键残基。这可以用计算机软件RASMOL（http://www.umass.edu/microbio/rasmol/）计算残基之间的距离。一般说来，如果确定的FR关键残基在鼠源抗体上和人源抗体上不一致，则用鼠源抗体上的FR残基代替人源抗体上的残基，以维持CDR的结构，但是为了减少免疫原性，能用人源抗体上FR中的残基或者是两者都可以使用的情况下，优选人源抗体上的FR残基，如用人源抗体上FR残基上的Ser残基代替鼠源抗体上的Thr残基，对CDR的结构影响很小，因此优选Ser。

尽可能减少人源化抗体的免疫原性

减少设计的人源化抗体的可变区的免疫原性的重要一步是：检查人源化抗体可变区

中是否存在低使用频率或者是非典型的氨基酸残基，一般认为出现频率为10%～20%以下的氨基酸属于非典型氨基酸，可能是来源于抗体重排过程中体细胞突变，可以用胚胎基因中可变区中相应的氨基酸或者通用的氨基酸来代替。

检查所选的可变区是否存在*N*-糖基化

人源化抗体可变区序列中*N*-糖基化会影响抗体的CDR抗原结合位点，对抗体的免疫原性和抗体的表达也有一定的影响。其中Asn-X-Ser/Thr（其中X是除了Pro外所有的氨基酸）序列是*N*-糖基化的位点，如果确定*N*-糖基化对CDR的结构无显著影响，则可以用Ala代替第一位Asn或者是第三位Ser/Thr，去除糖基化位点。因为*N*-糖基化会增加抗体的免疫原性，降低抗体的表达量。

选择合适的抗体重链的亚类

人源化抗体重链恒定区直接影响抗体的免疫效应，一般都选择IgG类型的，其中IgG1又是选择使用最多的亚类，尤其是该抗体用于抗肿瘤的治疗，IgG1较IgG2和IgG4有伸缩度更大的铰链区，因此其同抗原结合的亲和力更大，其引起的ADCC和CDC效应更强，治疗效果更佳。相反，如果想减少抗体引起的免疫效应，可以使用IgG2和IgG4来源的恒定区。

（三）人源化抗体的表达

1. 密码子的优化

完成了人源化抗体的设计后，下一步需要对编码的密码子进行优化，选择哺乳动物偏爱的密码子，去除稀有的密码子，具体哺乳动物偏爱的密码子表可参见http://www.kazusa.or.jp/codon/。

2. 在编码基因的起始序列ATG前后加上Kozak序列

Kozak序列是位于真核生物mRNA 5′端帽子结构后面起始密码子ATG前后的一段核酸序列，对真核生物基因的转录和翻译具有重要影响，它可以与翻译起始因子结合而介导含有5′帽子结构的mRNA翻译起始，从而提高其翻译效率。其通常是G/N-C/N-C/N-ANNATGG，如GCCACCATGG、GCCATGATGG时，转录和翻译效率最高，特别是第3位的A和第4位的G对翻译效率非常重要。对应于原核生物的SD（Shine-Dalgarno）序列。

3. 酶切位点的设计

在基因的两侧加上合适的酶切位点，以方便后续的克隆。相邻的两个酶切位点至少要相隔三个碱基，在酶切位点的前面还要加上保护碱基，一般为三个，这是因为内切酶需要一定的辅助性碱基才能顺利切割，在没有辅助碱基的情况下，有的酶是可以切割的，但大部分酶需要辅助性碱基才能有效切割，否则PCR产物很难被酶切，增加了载体构建的难度，甚至导致连接的失败。

4. 选择合适的表达载体

目前可用的哺乳动物表达载体很多，也有很多商业化的表达载体可供选择，轻链、重链的表达可以采用同时克隆到一个表达载体上，在轻链、重链序列之间加上IRES位

点，也可以将轻链、重链基因分别克隆到单独的载体上，同时转染哺乳动物细胞。

此外，选择一个合适的扩增基因也非常重要。目前常用的真核细胞表达载体上都有扩增基因，如二氢叶酸还原酶（dihydrofolatereductase，DHFR）基因、谷氨酰胺合成酶（glutamine synthetase，GS）基因等。本实验中以DHFR基因为例，DHFR的主要功能为催化二氢叶酸还原成四氢叶酸，为核苷酸合成必需的酶。氨甲蝶呤（methotrexate，MTX）的结构类似叶酸，与DHFR结合的能力比叶酸强1000倍，故是一种极强的竞争性抑制剂。当携带DHFR基因的表达质粒转染DHFR基因缺陷的CHO细胞后，CHO细胞生长可被MTX所抑制，不断提高MTX浓度，绝大多数细胞死亡，但在极少数幸存下来的抗性细胞中，DHFR基因均得以扩增，导致与DHFR串联在一起的外源基因的共扩增，拷贝数可增加几百到几千倍，从而使目的基因高水平表达，从而抵消MTX的抑制效应。

根据所用的表达载体的差异，如果所用的表达载体所包含的恒定区是来源于cDNA的，则3′端直接和恒定区序列相连，避免翻译时密码子的移位，如果恒定区是来源于基因组的序列，则需在设计的序列3′端需要加上剪切位点。通过人工合成的方法或者用多对引物进行重叠PCR的方法合成目的基因序列。经上述设计后，V_H 和 V_κ 基因长度为400～450bp。

（四）稳定表达人源化抗体细胞株的构建

常用稳定表达抗体的细胞株有CHO细胞、Sp2/0和NS0细胞，本实验中以DHFR基因缺陷的CHO细胞（$CHO/DHFR^-$）为例。

目前常用的将重组子导入宿主细胞的方法有脂质体融合法和电转染法，其中以电转染效率较高，本实验中以电转染法为例，脂质体转染参见第十八章基因克隆和表达技术。

材料与试剂

宿主细胞：$CHO/DHFR^-$

已构建的轻、重链基因质粒DNA

电转染仪

电穿缓冲液：20mmol/L Hepes pH7.05、0.7mmol/L Na_2HPO_4、137mmol/L NaCl、5mmol/L KCl、6mmol/L葡萄糖和4mmol/L β-巯基乙醇

完全培养基：RPMI-1640或DMEM加10%胎牛血清的培养液

选择性培养基：含MTX的完全培养基，其中MTX的浓度为150nmol/L

羊抗人κ链特异性抗体（Jackson公司）

HRP标记的羊抗人Fcγ段特异性的抗体（Jackson公司）

洗涤液：PBS含0.05% Tween20

显色液：OPD，Sigma

人IgG标准品

37℃，5%CO_2 细胞培养箱

步骤

1）收集对数生长期的宿主细胞，室温下 400g 离心 10min，用 300μl 冰预冷的 PBS 重悬细胞，细胞总量为 5×10^6～10×10^6 个。

2）质粒的线性化：将 30μg 质粒用单一位点的限制性内切核酸酶酶切，纯化后溶解在 100μl 的冰预冷的电穿缓冲液中。

3）电转染：将质粒加入到宿主细胞中，混匀（在冰上进行），用电转染仪进行电穿孔转染，电穿参数为 450V，25μF，然后将样品杯取出，置冰浴 10min。

4）在选择性培养基中培养：用 20ml 完全培养基悬浮细胞后，按每孔 100μl 加入 96 孔板在 CO_2 培养箱中培养，48h 后加入选择性培养基，100μl/孔。

5）换液：每周换 2 次液，每次吸弃 100μl/孔旧培养基，加入 100μl/孔的新鲜的选择性培养基。

6）0～14d 后，在显微镜下可见单个细胞克隆的形成，此时可以用 ELISA 检测细胞培养上清中人源化抗体 IgG 的分泌。

7）ELISA 夹心法检测 IgG 的分泌：所用的包被抗体为羊抗人 κ 链特异性抗体，按每孔 100μl 加入培养上清或人 IgG 标准品（阳性对照），室温孵育 1h 后，洗涤 3 次，加入 HRP 标记的羊抗人 Fcγ 段特异性的抗体室温孵育 1h 后，同样洗涤 3 次，加入显色液，避光显色 30min，用 2mol/L H_2SO_4 50μl/孔终止显色，用酶联仪检测 OD_{490}，参比波长为 570nm。

注意事项

除了用上述方法检测抗体的分泌情况外，如果有能跟抗体结合的可溶性抗原，也可以用 ELISA 检测其结合抗原的能力，用特定的抗原包被酶标板后，用上述相同的过程检测分泌的 IgG 结合抗原的能力。

（五）人源化抗体的特异性和亲和力的检测

人源化抗体的亲和力同鼠源抗体比较，如果其亲和力有显著下降，则表明 V_H 和 V_L 的 FR 与 CDR 不匹配，必须重新设计其 FR。检测其亲和力常用的方法有竞争性结合法、生物传感器分析法。其中竞争结合法技术成熟，所需的仪器设备为常规实验仪器，大多数实验室可以采用，不足之处是有时需要用同位素，且耗时长。而生物传感器分析法则是用 Biacore3000 或者是 ABI8500 Affinity Chip Analyzer 仪器直接测定抗原抗体之间的亲和力，其原理是基于表面等离子共振技术（surface plasmon resonance），抗原抗体之间发生相互作用时，其作用的强弱可以通过生物传感器来测定，可以非常方便地测定待测抗体的亲和常数和解离常数，而且同竞争法相比，省去了抗体和抗原的标记，且所需要的抗体和抗原的量非常少，有利于大规模筛选高亲和力的抗体。这是新近研究蛋白质之间相互作用的有力工具，但是仪器的高昂价格限制了其广泛的应用。当然，除了测定抗体的亲和力外，抗体的生物学活性测定也很重要，具体的测定方法要视每个抗体的生物学活性而定。下面介绍竞争性结合法。

材料与试剂

鼠源抗体，人源化的抗体
同位素：^{125}I（Perkin-Elmer）
氯胺 T
PBS
焦亚硫酸钠（sodium metabisulfite）
脱盐层析柱
真空抽滤泵
玻璃纤维滤纸
γ 计数仪

步骤

1. 鼠源抗体的标记

抗体标记常用的有同位素、HRP 和荧光染料，如果所用的抗原为可溶性抗原，则用 HRP 标记的抗体，用 ELISA 方法进行检测；当抗原是表达在细胞表面的分子时，常用同位素法检测；而荧光染料标记一般用 FACS 方法进行分析时采用。

以下简述用氯胺 T 法将^{125}I 标记到鼠源抗体上的方法。

1）将 60μg 鼠源抗体溶解在 50μl PBS 中，加入 1mCi ^{125}I，混合。

2）加入 50μl 氯胺 T（0.2mg/ml），室温孵育 2.5min。

3）将 25μg 焦亚硫酸钠溶解在 50μl 的 PBS 中，溶解后加入上述溶液中终止反应。

4）用脱盐层析柱将游离的^{125}I 去除。

2. 测定 IC_{50}

1）将含有表面抗原的细胞按每孔 2×10^5 个的密度铺在 24 孔板上，将一定量的^{125}I 标记的鼠源抗体（100 000cpm，10μCi/μg）和待测的人源化抗体或者未标记的鼠源抗体（0.2～700nmol/L）混合后加入细胞培养孔中，将混合物在冰上轻轻摇动 1～2h。

2）用真空抽滤的方式将细胞吸附到玻璃纤维滤纸上，而未结合的抗体则被吸走，将滤纸用洗涤液清洗后，烘干，加入闪烁液，在 γ 计数仪上计数。

3）将细胞结合的同位素强度（y 轴）同未标记的抗体的浓度（x 轴）作图，分别绘制人源化抗体和鼠源抗体的竞争结合曲线，分别计算 IC_{50}，IC_{50} 的概念是使标记的鼠源抗体的计数只有其最大结合值的 50%时所需的竞争抗体的浓度。

4）通过 IC_{50} 的值，判断人源化抗体和鼠源抗体的亲和力的差异，IC_{50} 的值同亲和力成反比关系，IC_{50} 越大，则表明亲和力越小。

3. 测定亲和常数

1）设置两个平行孔，一孔中加入过量的非标记抗体（250μg/ml），为非特异性结合孔，另一孔中不加入非标记抗体，为总结合孔，然后在相应的两孔中加入不同浓度的^{125}I 标记的抗体，标记抗体的浓度可以从 10μg/ml 开始往下倍比稀释，

将混合物在冰上轻轻摇动 1～2h。

2）用同上述相同的方法收集细胞，测定细胞结合的同位素的量。

3）计算特异性结合的同位素的量，特异性结合的量＝总结合孔测定值－非特异性结合孔测定值。

4）用 Trucco 等（1980）的 Scatchard 的方法计算其亲和常数（association constant）。比较鼠源抗体和人源化抗体的亲和常数的值，比较两者之间亲和力的差异。

（六）高表达人源化抗体的细胞株的筛选

材料与试剂

氨甲蝶呤（MTX）

羊抗人 κ 链特异性抗体（Jackson 公司）

HRP 标记的羊抗人 Fcγ 段特异性的抗体（Jackson 公司）

洗涤液：PBS 含 0.05% Tween20

显色液：OPD，Sigma

人 IgG 标准品

步骤

1）挑选克隆：从本节（四）中挑选的 ELISA 方法测定的人源化抗体的表达量在 5mg/L 以上的克隆，进行克隆的有限稀释，继续进行 MTX 选择。

2）低浓度 MTX 选择（0.075～1.0μmol/L）：逐渐增加 MTX 的浓度，从最初的 0.075μmol/L，到 0.15μmol/L、0.3μmol/L、0.5μmol/L 和 1.0μmol/L，每隔 10d 或者 3 或 4 代用 ELISA 方法测定一次。如果抗体的表达量较前一浓度的 MTX 有升高，则表示 MTX 选择有效，可以继续进行选择；如果没有变化则继续观察或者进行亚克隆；如果表达量下降，则回到前一浓度或者进行亚克隆。

3）高浓度 MTX 选择（1.0～5μmol/L）：继续增加 MTX 浓度，从 1μmol/L、2μmol/L、3μmol/L、4μmol/L 到 5μmol/L，逐步增加，每次调整 MTX 所需的时间较低浓度培养时间长，每个浓度一般培养 3～4 周。如果抗体的表达量较前一浓度的 MTX 有升高，则表示 MTX 选择有效，可以继续进行选择，否则进行亚克隆或者回到前一浓度。

4）当 MTX 浓度达到 5μmol/L 时，用夹心 ELISA 法测定的细胞的总分泌量一直维持在 100mg/L 以下，则表明该克隆不具备大规模生产的条件，则回到前一浓度或者回到低浓度 MTX 选择的克隆，甚至从最低浓度 MTX 选择的克隆重新开始筛选克隆。

5）将高表达的克隆进行无血清培养驯化，逐步减少培养基中的血清浓度，目的使原来贴壁或半贴壁的细胞变成悬浮培养，以方便日后的大规模生产。

注意事项

1）一般细胞密度为 5×10^5 个/孔时，24h 后就可以测定其日分泌量（$\mu g/10^6$ 细胞 · d^{-1}），培养 4d 后就可以测定其总的分泌量（mg/L）。

2）MTX 浓度从低到高，越到后面所需要的培养时间越长，主要是保证高表达的克隆有足够的时间进行扩增。

3）用 MTX 筛选高表达克隆是一个既费时、费力又很容易失败的过程，而且有时候经验也非常重要，因此，在每一步克隆过程中，都要对相应高表达的克隆进行保种。

4）当 MTX 浓度达到 5μmol/L 时，其表达量一般达到了最高，不会再随着 MTX 浓度的增加，表达量相应的增加。

二、小分子抗体

除了将抗体进行人源化改造外，还可以通过基因工程方法将抗体进行各种改构，以适应不同使用目的。目前常用的改构基因工程抗体有双特异性抗体、偶联抗体（偶联毒素、酶、核素）、Fab 抗体（由完整的轻重链可变区和 Fd 构成）、F_V 抗体（由 V_H 和 V_L 构成）、单链抗体（single chain fragment variable，scF_V）（V_H 和 V_L 之间由一连接肽连接而成）、单域抗体（single domain antibody）（仅由 V_H 组成）和最小识别单位（minimal recognition unit，MRU）（由一个 CDR 组成）等。目前基因工程抗体研究较多的是小分子抗体，而单域抗体（V_H）MRU 由于不含有完整的抗原结合位点，因而作为抗体分子其特异性和亲和力较低。而具有完整抗原结合位点的 Fab、Fv 及 scFv 是目前小分子抗体研究的重点，尤其是 scFv。scFv 具有许多优点，分子质量小、组织穿透能力强、免疫源性低；由于 V_H 和 V_L 通过连接肽连接，稳定性好；基因结构简单，可以在细菌中大量表达；无 Fc 段，可以减少非特异性吸附，在体内的半衰期短，适合放射免疫成像检查；亲和力高，具有同亲本抗体具有同等的亲和性和特异性；在小分子抗体基因的 3′端接上适当的酶基因或毒素蛋白基因，即可大量产生酶联抗体或免疫毒素。因此在本部分重点介绍 scFv 抗体的构建过程。

材料与试剂

杂交瘤细胞株

大肠杆菌菌株 JM109，此菌含有 LacIq、LacZ、M15，可进行 α 互补试验检测重组子

克隆质粒 pUC19 及表达载体质粒

引物

RNA 提取、PCR 扩增所用试剂

cDNA 合成试剂盒

步骤

1. PCR 引物的设计和合成

在构建单链抗体时，根据 Ig 可变区基因的序列特点，以及已发表的小鼠 V_H 和 V_L 基因序列，设计一组通用引物，用于扩增大多数小鼠单克隆抗体的 V 区基因，5′引物可以针对不同亚类 Ig 引导区或骨架区序列 FR1，3′引物可以针对 FR4 或 CH1。为了便于克隆和表达，往往在引物两端引进合适的酶切位点。以下为常用的 PCR 引物序列

（供参考），在 V_H 的两端分别加入了 *Xho* Ⅰ和 *Spe* Ⅰ酶切位点，在 V_L 的两端加入了 *Xba* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点。

1）V_H 5′端引物（*Xho* Ⅰ）：5′-GGCTCGAGGTGCAGTCGACCA（AG）CT（GT）GTG(CG)AGTC(AT)GG-3′

2）V_H 3′端引物（*Spe*Ⅰ）：5′-GGACTAGTACCGCCGGATCCACCGCCACCCG AGC-CACCGCCACCTG(AC)（AG)GAGAC(AG)TGTGAGCGTGG-3′

3）V_L 5′端引物（*Xba* Ⅰ）：5′-CCTCTAGAGGCTCGGGCGGTGGTGGATC-CGGCGGTGGCGGTTCGGACATTG TGATGACCCAGTCTCCA-3′

4）V_L 3′端引物（*Eco*R Ⅰ）：5′-CCGAATTCGCAGTCTAGAATTATTTTAT（CT）TCCAGCTTGGTCCC-3′

2. PCR 反应扩增 V_H 和 V_L

从鼠杂交瘤细胞株中提取基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板，加入引物和其他试剂，进行 PCR 反应。反应液总体积为 100μl，加样如下：

5′端引物	0.5μl（约 0.2μg）
3′端引物	0.5μl（约 0.2μg）
2mmol/L dNTP	10μl
10×PCR 缓冲液	10μl
基因组 DNA	5μl（约 0.2μg）
ddH_2O	74μl

100℃变性 10min 后，加入 *Taq* DNA 聚合酶 0.5μl（5U/μl），进行 PCR 循环。V_H：94℃ 60s，65℃ 60s，72℃ 60s；V_L：94℃ 60s，60℃ 60s，72℃ 90s。各进行 30 个循环。

3. 目的基因克隆

V_H 和 V_L 扩增产物，经琼脂糖凝胶电泳回收后，以引物两侧的酶进行双酶切，即 V_H 用 *Xho* Ⅰ和 *Spe* Ⅰ双酶切；V_L 用 *Xba* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切，产生具有黏性末端的酶切扩增产物。分别与经同样双酶切的 pUC19 质粒连接，转化 JM109 菌。由于 pUC19 质粒含有 *Amp* 和 *LacZ* 基因片段，转化入 JM109 菌中会产生 α 互补作用；在含 IPTG 和 X-Gal 的 LB 平板上生长时会产生蓝色菌落；插入了目的基因（V_H 或 V_L）的重组子会导致 pUC19 *LacZ* 基因片段的失活，从而形成白色菌落。对白色菌落重组子进行双酶切鉴定，对酶切片段进行琼脂糖凝胶电泳，判断大小是否一致。

4. 双脱氧链终止法进行目的基因测序

DNA 序列测定常用 Sanger 双脱氧链终止法，其原理是 DNA 在复制时如果链端掺入单脱氧碱基的片段可继续延长，如果掺入双脱氧碱基则该链就停止延长，从而得到一系列长度不等的核酸片段，根据片段 3′端的双脱氧碱基，便可依次阅读合成片段的碱基排列顺序。目前常用自动化测序仪进行 DNA 测序，非常方便快捷。

5. 表达载体的构建

1）在 V_H3′（或 V_L3′）端和 V_L5′（V_H5′）端引物中加入连接序列（linker），采用

RT-PCR 的方法先分别扩增 V_H 和 V_L 基因，再进行重叠延伸 PCR 扩增含 V_H-linker-V_L 或 V_L-linker-V_H 基因。

2）用相应的酶酶切 V_H-linker-V_L 或 V_L-linker-V_H，与同样酶切的表达载体进行连接。

6. 表达菌株的建立

将构建的质粒转化感受态细胞，酶切鉴定片段大小，并进行测序。

注意事项

1）分别将 V_H 和 V_L 克隆至同一个表达载体中，中间无连接肽相连即为 Fv 的构建过程。

2）单链抗体的理想连接肽应保证 V_H 和 V_L 在表达系统中能等摩尔地产生，不干扰 V_H 和 V_L 的自由折叠，并使抗原结合位点处于适当构型，不引起分子动力学改变，尽可能减少蛋白酶攻击及防止单链抗体聚集等。目前最常用的连接序列为具刚性结构的 15 肽序列（$Gly_4Ser)_3$。

3）单链抗体的 C 端可引入不同的标签，如 His 尾、半胱氨酸残基等，以利于表达产物的检测、纯化和标记。如引入亮氨酸拉链、半胱氨酸及 α 螺旋等结构，可用于构建双价单链抗体。单链抗体基因与蛋白 A、毒素及其他蛋白质基因的连接，可构建成具有新功能的杂合抗体基因，用于制备供免疫分析、影像诊断及治疗用的基因工程抗体制剂。

第五节　抗体的纯化

由于抗体独一无二的特异性，抗体的应用越来越广，在科学研究、疾病的诊断和治疗中，抗体都得到了广泛的应用。而不同来源的抗体，根据不同的使用目的，其纯化过程和要求会不尽相同。例如，在有些情况下，经过初步沉淀离心后的抗体就可以直接用于免疫检测，而某些情况下如药用抗体，则需要经过数种层析技术的综合运用，才能达到临床使用的目的。纯化抗体的方法很多，如利用抗体的疏水性质可以用疏水层析分离，利用其等电点较一般蛋白质高，可以用阳离子交换层析。但是最常用和最有效的是利用抗体的 Fc 段跟蛋白 A（protein A）或蛋白 G（protein G）结合的特性进行一步分离。因此，本部分主要介绍用蛋白 A 或蛋白 G 亲和层析法纯化抗体的技术。在进行亲和层析法纯化抗体之前，来源于腹水和血清的抗体由于其含有较多的脂类物质，尚不能直接用亲和层析法进行纯化，需要对样品进行预处理去除脂类物质，而来源于细胞培养上清的抗体经过高速离心后就可以用于亲和层析法纯化。

一、样品的预处理

腹水和血清来源的样品中含有较多的脂类物质，尤其腹水来源的抗体甚至含有石蜡油，如果不去除，则会堵塞层析柱。去除的方法很多，常用的有沉淀法和过滤法，常用的沉淀剂有硫酸铵、辛酸和聚乙二醇（PEG）等，而过滤法常用的有玻璃棉和 0.45μm 的滤器。血清因含有的脂类物质相对少，常用玻璃棉过滤去除，而腹水中的脂类相对较多、较杂，一般是用硫酸铵沉淀的办法去除，当然也可以用 PEG 等试剂沉淀蛋白质，

但是硫酸铵由于方法简单，对抗体活性影响小，甚至可以起到稳定蛋白质结构的作用，因此最为常用，下面重点介绍硫酸铵沉淀法。

材料与试剂

腹水

PBS

饱和硫酸铵（SAS）

玻璃棉（Polysciences）或者 0.45μm 滤器

透析袋

步骤

1）腹水通常需先用玻璃棉过滤，去除脂类物质，再离心。4℃或室温下 10 000*g* 离心 10min，轻轻倒出上清，弃去含膜和细胞碎片的沉淀。向上清中加入等量的 PBS，混匀。

2）SAS 沉淀：边搅拌边慢慢在离心上清中一滴一滴加入 0.5 倍样品体积的 SAS，使终浓度为 33%（体积比），室温静置 1～2h 或 4℃静置过夜，保证使所有，室温静置 1～2h 或 4℃静置过夜，保证使目的蛋白沉淀。

3）室温下 10 000*g* 离心 10min，轻轻倒去上清。

4）透析：用最小体积的 PBS 溶解沉淀并转移到透析袋中，于 4℃在至少 20 倍体积的 PBS 中透析过夜，更换透析液 2 或 3 次。直到透析液中没有硫酸铵（加一滴 1% BaCl 到透析液中，没有沉淀出现即可）。

5）收集透析物，测定蛋白质浓度，分装后 4℃保存。粗提的抗体可直接应用（酶标记等），亦可进一步纯化。

注意事项

1）腹水中由于含有较多的纤维蛋白和脂类物质，高速离心后，比重较轻的脂类物质及液体石蜡浮在离心管的上层，吸取上清之前可小心吸出上层脂类及石蜡等杂质，必要时可以用玻璃棉过滤，尽可能去除脂类物质。在硫酸铵沉淀后视上清中脂类物质去除情况，如有必要，可进一步将溶解的沉淀用玻璃棉或者 0.45μm 的滤器过滤，进一步去除上清中遗留的少量脂类物质。

2）极少部分抗体在硫酸铵沉淀后会失活，需要注意。

3）除了使用 SAS 外，也可以使用固体硫酸铵，在使用固体硫酸铵时需要特别注意，部分杂蛋白质会在高浓度硫酸铵的作用下沉淀变性，从而影响后面的纯化，因此最好滴加 SAS 溶液。

4）除了透析，也可以用脱盐层析柱快速去除上清中的硫酸铵，更简单的是将上清用 PBS 稀释 5～10 倍后直接上亲和层析柱。

5）如果要得到较高纯度的 IgG，可在步骤 3）后用原抗体体积的 PBS 重悬沉淀，同样离心弃去不溶的沉淀物。按步骤 2）的方法用终浓度 33%的饱和硫酸铵再沉淀抗体 1 次。

二、蛋白 A 或蛋白 G 交联琼脂糖凝胶亲和层析法纯化抗体

虽然蛋白 A 或蛋白 G 对 IgG Fc 段具有特异性的吸附，但是不同种属来源和亚类的抗体 IgG 同蛋白 A 或蛋白 G 有不同的结合特性，在纯化时需要充分考虑。表 7-1 所列为不同种属和亚类的抗体与蛋白 A 和蛋白 G 的结合特性。

表 7-1　不同种属和亚类 IgG 同蛋白 A 和蛋白 G 的相对亲和力

种属	亚类	蛋白 A	蛋白 G	种属	亚类	蛋白 A	蛋白 G
人	IgG1	++++	++++	兔		++++	+++
	IgG2	++++	++++	马		++	++++
	IgG3	—	++++	猴		++++	++++
	IgG4	++++	++++	猪		+++	+++
小鼠	IgG1	+	++++	豚鼠		++++	++
	IgG2a	++++	++++	狗		—	++
	IgG2b	+++	+++	鸡		—	—
	IgG3	++	+++	牛		++++	+++
大鼠	IgG1	—	+	山羊		—	++
	IgG2a	—	++++	绵羊		—	++
	IgG2b	—	++				
	Ig2c	+	++				

注："—"表示不结合，"+"表示结合，"++"表示中等结合，"+++"表示较强结合，"++++"表示很强结合。

材料与试剂

经处理的澄清的腹水、血清或细胞培养上清，最好用经硫酸铵沉淀的粗提品。

PBS，pH7.4

蛋白 A 或蛋白 G 交联琼脂糖凝胶（Sepharose Protein A 或 Protein G，GE）

0.1mol/L 柠檬酸缓冲液，pH3.5

0.1mol/L 甘氨酸 · HCl，pH2.8

2mol/L Tris-HCl，pH8.0

透析袋

10ml 层析柱

步骤

1）柱床平衡：将一定量的 Sepharose Protein A 或 Protein G 装入层析柱中，于室温下用 2 个柱床体积的 PBS 平衡层析柱，至流出液基线稳定。

2）上样：将预处理的样品以一定的流速经过层析柱，收集流穿液。

3）洗涤未结合蛋白质：用数个柱体积的 PBS 洗柱，一直洗到 OD_{280} 到基线水平。

4）洗脱非特异性结合的蛋白质：一般用 50mmol/L pH5.0 的乙酸钠或柠檬酸缓冲液洗柱，收集洗脱峰。

5）抗体洗脱：用适当 pH 的溶液洗脱目的蛋白，一般用 0.1mol/L pH2.8 甘氨酸 · HCl，或用 0.1mol/L pH3.5 柠檬酸缓冲液洗脱结合的抗体。

6）SDS-PAGE 鉴定各步收集的样品，鉴定流穿和洗脱纯度，分析各步骤抗体损失情况。

7）合并含目的蛋白的组分，加入透析袋，用含或不含 0.02% NaN_3 的 1L PBS pH7.3 透析，期间更换 2 或 3 次透析液。收集透析物，测定蛋白质浓度，分装后 4℃保存。必要时可用 SDS-PAGE 进行纯度鉴定。

8）层析柱可以直接用 0.1mol/L pH2.8 甘氨酸 · HCl 洗柱再生，或者用 3mol/L 硫氰酸钾清洗，然后再用数个柱体积的 PBS pH7.3 洗柱，最后 4℃保存在 20% 乙醇中。

注意事项

1）蛋白 A 通常用于人（除 IgG3 外）、小鼠（除 IgG1 外）、兔、豚鼠和猪抗体的纯化，蛋白 G 的结合谱则较蛋白 A 更广，能结合人和小鼠的所有 IgG 类抗体，且亲和力强。

2）蛋白 A 能同白蛋白非特异性的结合，而蛋白 G 同白蛋白非特异性的结合弱。

3）每毫升 Sepharose Protein A 可结合 3～10mg 小鼠 IgG 或 30mg 人 IgG，每毫升 Sepharose Protein G 一般可结合 10mg 小鼠 IgG 或人 IgG 30mg，但不同种属抗体结合量有所不同。

4）可用 SDS-PAGE 法或者 ELISA 法检测流穿液中是否有抗体，以判断上样量是否过量。

5）洗脱缓冲液 pH：用蛋白 G 纯化抗体时，由于结合力强，一般需要用 pH2.7 甚至更低，才能洗脱，而蛋白 A 则相对结合力弱，可以用相对高的 pH 洗脱，因此，在抗体活性对低 pH 比较敏感的情况下，可以考虑用蛋白 A 进行纯化，用 pH3.5 的缓冲液进行洗脱。

6）低 pH 会损伤抗体，因此洗脱前在收集管内加入 2mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液（50μl/ml 洗脱液）立刻用于中和酸。

7）电泳检测抗体的纯度：用 10%非还原型和还原型聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白质纯度，在非还原型凝胶上 IgG 的条带在 150kDa 左右，在还原型凝胶上，55kDa 左右的条带为 IgG 重链，25kDa 左右的条带为 IgG 的轻链，两者的染色强度比例为 2∶1。

8）抗体的含量可以通过测定 OD_{280} 的值计算，IgG 含量为 1mg/ml 时 OD_{280} =1.43。

9）通过以上两步分离法，IgG 的纯度可以达到 90%以上，能够满足大部分实验的要求，但是由于蛋白 A 或蛋白 G 并不能有效地去除血清或培养基中非目的抗原特异性的 IgG，因此在纯化的抗体中有许多并不是所需抗原特异性的 IgG，单纯通过蛋白 A 或蛋白 G 亲和层析就很难去除，需要用偶联抗原的特异性免疫亲和层析进行分离纯化，如果终产品是应用于人体的，那么在抗体培养过程中，应尽量避免使用牛血清。

（蒋应明　田野苹）

参考文献

焦炳华，孙树汉. 2007. 现代生物工程. 北京：科学出版社. 471～517.

科利根 JE，比勒 BE，马古利斯 DH，等. 2009. 精编免疫学实验指南. 曹雪涛，于益芝，孙卫民，等译. 北京：科

学出版社. 44～45.

孙卫民，王惠琴. 1999. 细胞因子研究方法学. 北京：人民卫生出版社. 247～277.

Dall'Acquaa WF, Damschrodera MM, Zhang JL, et al. 2005. Antibody humanization by framework shuffling. Methods, 36 (1): 43～60.

Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. Methods Enzymol, 266: 383～402.

Jones PT, Dear PH, Foote J, et al. 1986. Replacing the complementarity determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature, 321 (6069): 522～525.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

Kashmiri SVS, De Pascalis R, Noreen R, et al. 2005. SDR grafting-a new approach to antibody humanization. Methods, 36 (1): 25～34.

Levy R, Assulin O, Scherf T, et al. 1989. Probing antibody diversity by 2D NMR: comparison of amino acid sequences, predicted structures, and observed antibody-antigen interactions in complexes of two anti-peptide antibodies. Biochemistry, 28 (18): 7168～7175.

Qu Z, GriYthsa GL, Wegenera WA, et al. 2005. Development of humanized antibodies as cancer therapeutics. Methods, 36 (1): 84～95.

Queen C, Schneider WP, Selik HE, et al. 1989. A humanized antibody that binds to the interleukin-2 receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 86 (24): 10029～10033.

Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, et al. 1985. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. J Immunol, 135 (2): 1530～1535.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res, 22 (22): 4673～4680.

Trucco M, de Petris S, Garotta G, et al. 1980. Quantitative analysis of cell surface HLA structures by means of monoclonal antibodies. Hum Immunol, 1 (3): 233～243.

Zilber B, Scherf T, Levitt M, et al. 1990. NMR-derived model for a peptide-antibody complex. Biochemistry, 29 (43): 10032～10041.

第八章 补　　体

第一节 概　　述

补体（complement）是存在于人和动物血清与组织液中的一组经活化后具有酶活性的蛋白质。19 世纪末 Bordet 发现，新鲜血液中含有一种不耐热的成分，可辅助特异性抗体介导免疫溶菌、溶血作用，将其命名为补体。目前已知补体是由 30 余种可溶性蛋白、膜结合性蛋白和补体受体组成的多分子系统，称为补体系统。根据补体系统各成分的生物学功能，将其分为补体固有成分、补体调节蛋白和补体受体。

补体固有成分是存在于血浆及体液中，构成补体基本组成的蛋白质，可分为以下 4 类：①经典激活途径的 C1q、C1r、C1s、C2、C4；②旁路激活途径的 B 因子、D 因子和 P 因子；③甘露聚糖结合凝集素（MBL）激活途径的 MBL 和 MBL 相关丝氨酸蛋白酶（MASP）；④参与共同末端通路的 C3、C5、C6、C7、C8、C9。

补体调节蛋白存在于血浆和细胞膜表面，是通过调节补体激活途径中关键酶活性而控制补体活化强度的蛋白质分子。包括血浆中 H 因子、I 因子、C1 酯酶抑制剂（C1INH）、C4bp、S 蛋白等；存在于细胞膜表面的衰变加速因子（DAF）、膜辅助蛋白（MCP）等。

补体受体是指存在于多种细胞膜表面、能与补体激活时产生的活性片段结合，介导生物学效应的受体分子，包括 CR1、CR2、CR3、CR4 等。

补体大多属于 β-球蛋白，少数属于 γ-球蛋白和 α-球蛋白。人血清中补体占蛋白质总量的 15%，其中 C3 含量最高（1300μg/ml），D 因子含量最低。实验动物中豚鼠血清补体含量最丰富，也容易获得，所以常提取豚鼠血清作为实验室补体来源。

补体活性不稳定、不耐热，56℃ 30min 即可被灭活。补体在被激活前无生物学功能，多种外源性和内源性物质通过启动一系列丝氨酸蛋白酶的级联反应激活补体。

补体激活过程依据起始顺序不同，分为 3 条途径：①从 C1q-$(C1r)_2$-$(C1s)_2$ 开始的经典途径，抗原抗体复合物为主要激活物；②从 C3 开始不依赖抗体的旁路途径；③通过甘露聚糖结合凝集素糖基识别的凝集素激活途径。上述 3 条途径有共同的终末反应过程。

补体形成的活化产物具有调理吞噬、溶解细胞、介导炎症、调节免疫应答和清除免疫复合物的生物学功能。补体不仅是机体天然免疫防御的重要部分，也是抗体发挥免疫效应的主要机制之一，还能调节免疫系统功能。补体成分及调节蛋白的缺失可导致一些疾病发生，因而检测补体成分活性和含量，对补体相关疾病的诊断、发病机制的研究具有重要意义。

第二节　补体活性的测定

一、血清补体总活性的测定

自从 1942 年 Rustein 和 Walker 根据补体能使兔抗羊红细胞抗体致敏的羊红细胞发生溶血的特点建立了检测血清中总补体活性的方法后，几十年来，研究者又建立了许多改进的方法，其中试管法最为经典，近年来又创建了脂质体均相免疫检测法，用于血清补体总活性的检测。

（一）试管法测定血清补体总活性

绵羊红细胞（sheep red blood cell，SRBC）与相应抗体结合形成的致敏红细胞可激活补体，从而导致 SRBC 溶解。当致敏红细胞浓度恒定时，溶血程度与补体的活性成正比。将待检血清做一系列稀释后，分别加入抗体致敏的红细胞进行反应，测定溶血程度，可判定待检血清的总补体活性。由于溶血程度在 50%附近时，补体的用量稍有变化就会对溶血程度产生很大的影响。所以通常以 50%溶血程度（50% complement hemolysis，CH_{50}）作为判定反应终点的指标，而不用 100%溶血程度（图 8-1）。

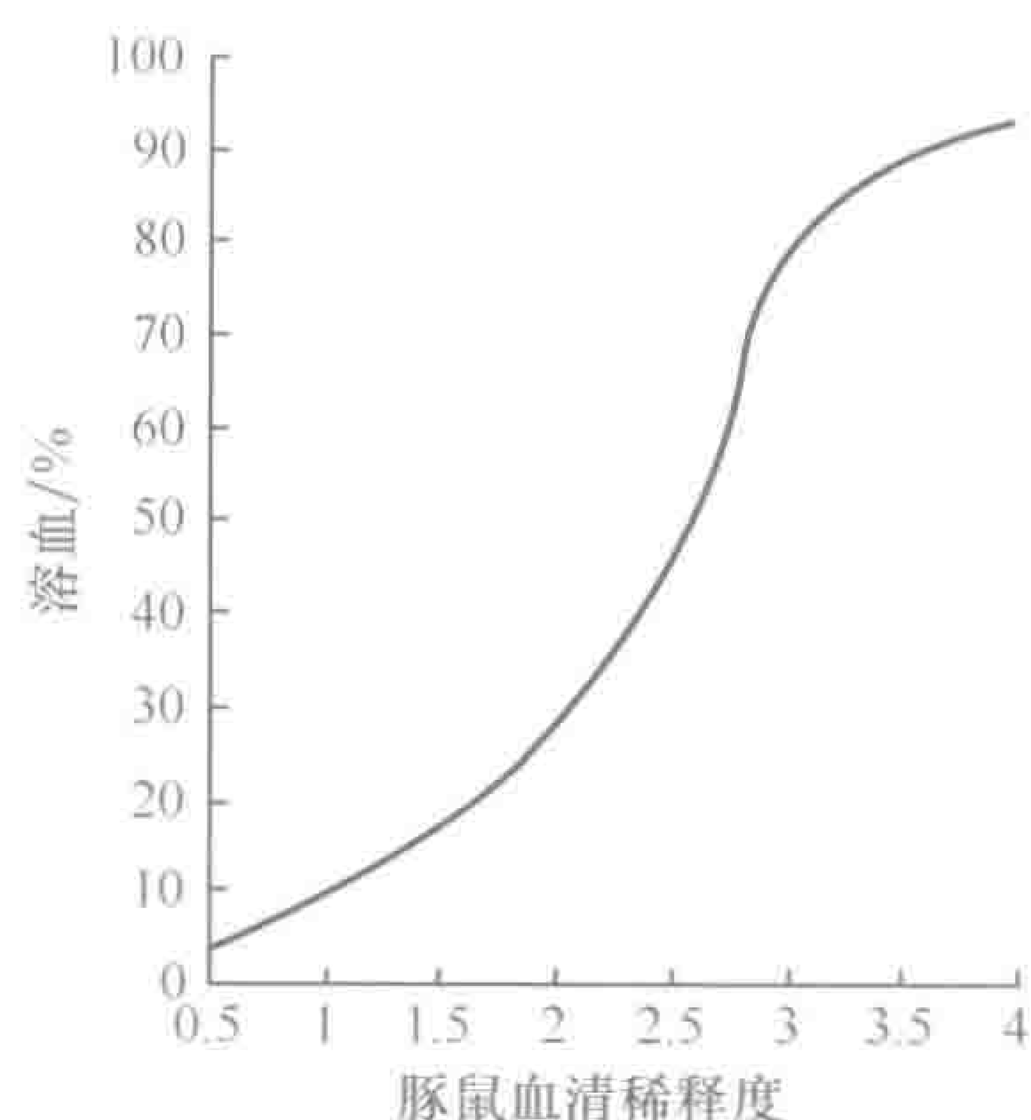


图 8-1　溶血程度与补体含量的关系

试管法是经典的检测血清补体总活性的方法，本方法快速、操作较为简便，主要用于测定补体经典激活途径的溶血功能，不能测定补体蛋白质的绝对值。本方法每次需新鲜制备 SRBC，细胞批次间差异大，难以定量，干扰因素多。CH_{50} 正常参考值为 50～100U/ml。CH_{50} 异常见于：①CH_{50} 增高可见于急性炎症、组织损伤、恶性肿瘤等；②CH_{50} 降低多见于免疫复合物型超敏反应，如系统性红斑狼疮活动期、急性肾小球肾炎、类风湿性关节炎和严重肝病等。

材料与试剂

绵羊红细胞（SRBC）

溶血素：抗 SRBC 抗体，是以 SRBC 作为抗原免疫家兔所得。可购买商品化制剂，按照说明稀释为标定效价使用；也可自行制备，需先滴定其效价，然后稀释至 2U/ml

巴比妥缓冲液（pH7.4）：贮存液，将 5.75g 巴比妥、3.75g 巴比妥钠、85.00g NaCl、1.02g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$、0.2g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 逐一加入双蒸水中，补加双蒸水至 2000ml，过滤，4℃保存。应用液，将贮存液与双蒸水按 1∶5 稀释而成，当日使用

Alsever 液：20.5g 葡萄糖，7.9g 柠檬酸钠 · $2H_2O$，4.2g NaCl，溶于 900ml 双蒸水中。用 1mol/L 柠檬酸调节 pH 至 6.1，补加双蒸水至 1L，无菌过滤，4℃保存

试管

分光光度计

水平离心机

步骤

1）稀释血清：待检血清 0.2ml，加 3.8ml 稀释液，稀释度为 1∶20。

2）配制 SRBC 悬液：自绵羊颈静脉采血，注入装有等量 Alsever 液的无菌三角烧瓶中，轻摇 3～5min，分装，4℃保存。临用时，生理盐水洗涤 3 次后，用生理盐水将 SRBC 配成 1×10^9 个/ml，用分光光度计测定其 OD_{542} 值，以后每次实验均参照此 OD 值校正 SRBC 浓度。

3）配制致敏 SRBC：取 2U/ml 溶血素与 1×10^9 SRBC/ml 悬液等量混合，37℃水浴 30min。温育过程中应经常摇动。致敏后用缓冲液洗涤 3 次，制成 5×10^8 个/ml 浓度的致敏 SRBC 悬液。

4）配制溶血标准管：2ml 致敏 SRBC 中加入双蒸水 8ml，混匀，即为全溶血管。取 2ml 全溶血管液加入 2ml 巴比妥缓冲液，得到 50%溶血管。

5）按表 8-1 所示，依次加入各成分，37℃水浴 60min。室温下 2000g 离心 10min。取上清，再与 CH_{50} 标准管比较，观察溶血程度。

表 8-1 补体 CH_{50} 单位的测定

管号	1∶20 血清样本/ml	巴比妥缓冲液/ml	致敏 SRBC/ml	结果/（U/ml）
1	0.10	1.40	1.0	200
2	0.15	1.35	1.0	133
3	0.20	1.30	1.0	100
4	0.25	1.25	1.0	80
5	0.30	1.20	1.0	66.6
6	0.35	1.15	1.0	57.1
7	0.40	1.10	1.0	52
8	0.45	1.05	1.0	44.4
9	0.50	1.00	1.0	40
10	—	1.50	1.0	—

取与 CH_{50} 标准管相接近的二管在分光光度计上分别读取 OD_{542} 值，以最接近 CH_{50} 标准管 OD 值的一管，按公式求得 CH_{50} 的总补体活性值：血清总补体活性（CH_{50}）＝1/（血清用量×稀释倍数）。本法测得血清总补体活性 CH_{50} 的正常值为 50～100U/ml。

注意事项

1）待检血清必须新鲜，如放置室温 2h 以上，可使补体活性下降。

2）待检血清还应无溶血、无污染等。

3）实验器材应清洁，残留的酸碱等化学物质均可使补体受破坏。

4）SRBC 等试剂均应新鲜配制。

5）补体的溶血活性可受多种因素的影响，如溶液的酸碱度变化、钙和镁离子增加等可使补体溶血活性下降；SRBC 浓度和致敏 SRBC 吸附溶血素的量等可直接影响溶血程度，当每一致敏 SRBC 吸附的抗体分子少于 100 个时，溶血程度随红细胞浓度的增加而减少，当使用高浓度溶血素致敏时，溶血程度则随红细胞浓度的增加而增加。

（二）脂质体均相免疫检测法测定血清补体总活性

1995 年 Yamamoto 等创建了“脂质体免疫检测法”（liposome immunoassay）用于测定血清补体总活性。其原理如图 8-2 所示，构建由一个极性部分（磷脂中的胆碱）和一个非极性部分（磷脂中的烷基）组成的封闭性脂质体颗粒，在脂质体的内部水相中包入水溶性的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G-6-PDH）；脂质体层中镶嵌抗原——二硝基苯酚（DNP）。将脂质体作为“人造红细胞载体”，抗 DNP 抗体与脂质体层中的 DNP 结合形成免疫复合物，继而激活血清样品中的补体，攻击并破坏脂质体膜，致使脂质体内的酶释放并与底物反应，使试剂中的 NAD 还原成 NADH，导致吸光度发生变化。吸光度的增减与血清中总补体活性呈正相关。

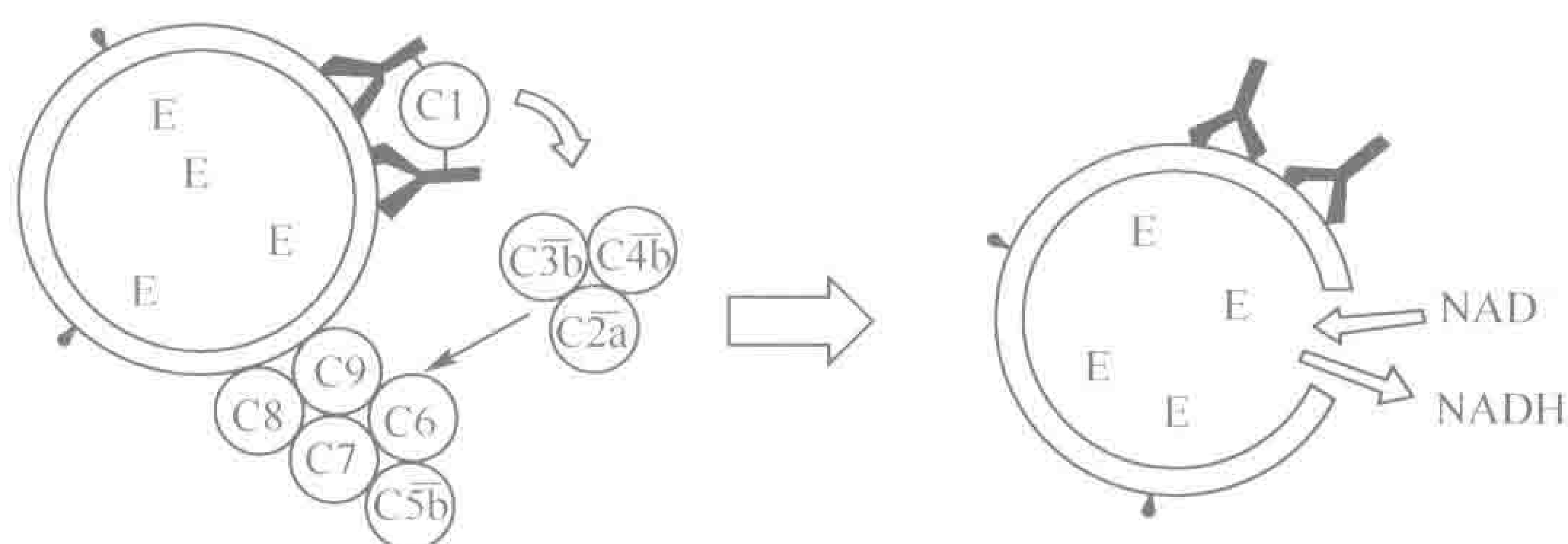


图 8-2 脂质体免疫均相检测法原理示意图

本法简便、快速、血清用量少，适用于自动化定量分析，检测精度、特异性高，目前已在临床和科研工作中大量推广，有望成为测定血清补体总活性的主流方法。

材料与试剂

试剂 1：脂质体颗粒（图 8-3），由一个极性部分（磷脂中的胆碱）和一个非极性部分（磷脂中的烷基）组成的封闭性脂质体颗粒，在脂质体的内部水相中包入水溶性的 G-6-PDH；DNP

试剂 2：含有酶底物的羊抗 DNP 抗体溶液（图 8-4），酶底物为 24mmol/L 6-磷酸葡萄糖（G6P）和 9mmol/L NAD^+（辅酶Ⅰ）

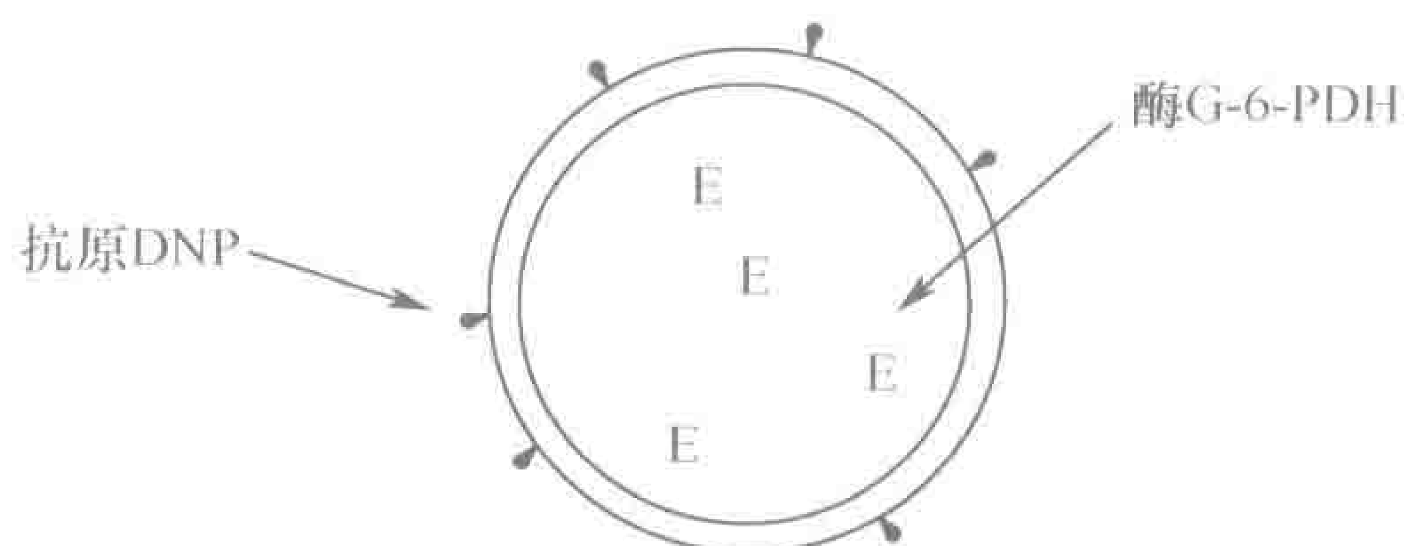


图 8-3 试剂 1

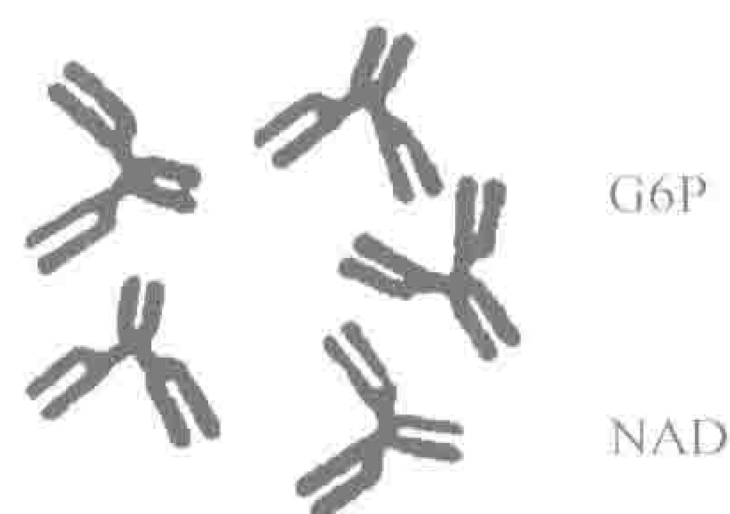


图 8-4 试剂 2

酶联检测仪或自动生化分析仪

步骤

10μl 血清样品与 250μl 脂质体混合，5min 后加入抗体和酶底物（试剂 2），作用4～5min，于自动分析仪测定 OD_{340} 值。OD 值与血清样品中补体活性成比例关系，本法所测 CH_{50} 的正常值为 33～70U/ml，与经典的试管法对比测定结果的相关系数为 0.81～0.923。

二、补体旁路途径的总补体活性的测定

兔红细胞（rabbit red blood cell，RRBC）可不经过致敏即激活人补体旁路途径，导致兔红细胞溶解，其溶血程度与血清旁路途径的补体量呈正相关。在反应体系中加入乙二醇双氨基四乙酸（EGTA）可螯合血浆 Ca^{2+}，由于 EGTA 与 Mg^{2+} 结合能力很弱，所以能同时封闭经典途径；根据 RRBC 的溶血程度，可测定补体旁路途径的总补体活性。与 CH_{50} 测定相似，以引起 50% 溶血所需最小补体量为一个旁路途径溶血活性（ACH_{50}）单位，据此计算出旁路途径补体溶血活性。

本法主要反映补体旁路途径的溶血活性。旁路途径溶血活性显著增高见于某些自身免疫病、肾病综合征、慢性肾炎、肿瘤和感染等；降低则见于肝硬化、慢性活动性肝炎、急性肾炎等病症。本实验方法较为快速、简便，准确度高。

材料与试剂

RRBC 悬液的制备

Alsever 液（配制方法见上述试管法）

0.1 mol/L EGTA-Mg^{2+} 溶液：38.00g EGTA，20.30g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$，7.00g NaOH，溶于 1000ml 双蒸水中，pH7.4

5×巴比妥缓冲液：85g NaCl，5.75g 巴比妥酸，3.75g 巴比妥钠，1500ml 蒸馏水

0.1mol/L 乙二胺四乙酸三钠原液（$EDTA\text{-}Na_3$）：37.23g $EDTA\text{-}Na_3$，4.0g NaOH，加双蒸水至 1000ml，pH7.4

0.01mol/L EGTA-GVB^{2+} 应用缓冲液：360ml 5×巴比妥缓冲液，200ml 0.1mol/L $EGTA\text{-}Na_3$ 原液，100ml 2% 明胶溶液，补足双蒸水至 2000ml，调 pH 至 7.4

水平离心机

微量试管

水浴锅

分光光度计

步骤

1）制备 RRBC 悬液，无菌采兔耳静脉或心脏血（参见附录 B），加等量 Alsever 液抗凝，分装，4℃可保存 1 周左右。试验时取一定量的 RRBC，先以 EGTA-GVD^{2+} 应用缓冲液洗涤 3 次，并用该缓冲液配制成 3×10^8 个/ml 细胞悬液。

2）1ml 待检血清中加 4ml EGTA-GVB^{2+}应用缓冲液，稀释为 1∶4 的待检血清。

3）配制溶血标准管：2ml RRBC 悬液中加入 8ml 双蒸水，混匀，即为全溶血管。取 2ml 全溶血管液加入 2ml 应用缓冲液，得到 50%溶血管。

4）按表 8-2 所示，在各管中依次加入各成分，混匀，37℃水浴 30min，再 2000*g* 室温离心 10min，取上清。

表 8-2　补体 ACH_{50} 测定

管号	1∶4 血清样本/ml	应用缓冲液/ml	RRBC/ml
1	0.10	0.5	0.4
2	0.15	0.45	0.4
3	0.20	0.4	0.4
4	0.25	0.35	0.4
5	0.30	0.30	0.4
6	0.35	0.25	0.4
7	0.40	0.6	—

5）结果测定：方法同 CH_{50} 测定。取离心上清，分光光度计读取 OD_{542} 值，然后计算每毫升血清样本 ACH_{50} 单位（方法同 CH_{50} 测定）。正常值为 21.8±5.4U/ml（$\bar{x}\pm s$）。

第三节　补体介导的细胞毒实验

带有特异抗原的淋巴细胞（靶细胞）在体外与相应抗体结合后，在补体的参与下引起靶细胞的死亡。靶细胞的杀伤可以借助形态学方法、MTT 比色法和同位素释放法加以测定。

一、形态学方法检测补体介导的细胞毒活性

带有特异抗原的淋巴细胞（靶细胞）在体外与相应抗体结合后，在补体参与下引起靶细胞死亡。靶细胞杀伤与否可借助染料（台盼蓝或伊红 Y）排斥现象判定。靶细胞被杀伤后，细胞膜通透性增加、细胞肿大，可被台盼蓝着色；活细胞无色，有光泽且形态正常。

本实验主要用于检测细胞膜抗原，也可用于测定细胞毒抗体的效价和活性。本方法可用于基础研究，也可在临床上用于器官移植的组织配型鉴定。在具体实施中，本方法又可分为试管法和微量法。

材料与试剂

淋巴细胞：常规方法分离人淋巴细胞（参见附录 B），用 Hanks 液配成 1×10^6 个/ml的细胞悬液

抗 HLA 血清：采用经产妇血清、多次受血者的血清、肾移植排斥者的血清或单克隆抗体

补体：选用健康家兔免疫的新鲜血清，20 只以上兔的新鲜血清混合而成，分装于

灭菌青霉素小瓶内。在无 HLA 抗血清时应无淋巴细胞毒性。−70℃贮存。用前半小时取出室温融化，使用后剩余液弃去，不得反复冻融

对照血清：阴性对照最好选用健康男性无输血史的 AB 型血清，56℃ 30min 灭活，或选用 56℃30min 灭活的健康人混合血清。阳性对照采用马抗人淋巴细胞

2%台盼蓝溶液：先以双蒸水配成 4%溶液贮存，用前以等量 1.8%NaCl 稀释，离心取上清使用

试管

微量细胞培养板

倒置显微镜

水浴锅

步骤

1. 试管法

1）将 HLA 血清 0.1ml 加入试管中，阴性对照管内加阴性血清 0.1ml，阳性对照管内加入阳性血清 0.1ml。

2）各管中均加入淋巴细胞悬液 0.1ml，混匀，37℃水浴 30min。

3）各管中均加入补体 0.5ml，混匀，37℃水浴 30min。

4）结果判定：各管内加入 2%台盼蓝溶液 0.3ml，混匀，5min 后取样，滴片镜检，光镜下观察细胞形态。先用低倍镜观察各孔中出现的蓝色杀伤细胞的百分率，“++”判定为效价。死细胞 ≤10%计为−；死细胞 10%～20%计为±；死细胞 20%～40%计为+；死细胞 40%～70%计为++；死细胞>70%计为+++；高倍镜下计数 200 个细胞中死细胞的百分率：细胞毒百分率＝（试验管死细胞平均百分率%−对照管死细胞平均百分率%）/100%−对照管死细胞平均百分率%。

2. 微量法

1）用微量细胞培养板代替试管，取 1μl 的阳性血清、阴性血清和抗 HLA 血清分别加入各板孔中。

2）各孔中加入淋巴细胞悬液 1μl，37℃水浴 30min。

3）各孔中加入补体 5μl，再次 37℃水浴 30min。

4）结果判定：各孔内加入 2%台盼蓝溶液 3μl，混匀，5min 后取样，滴片镜检，光镜下观察细胞形态。

注意事项

1）使用试管法与微量法时均需做 3 个复管（孔）。两法所得结果一般无显著差异。试管法简便易行，但所需试剂量大；微量法所需试剂量少，操作要求精细。

2）实验中需要制备对照，阴性对照死亡细胞数应小于 10%，阳性对照应大于 80%；否则需寻找原因。

3）台盼蓝对细胞具有一定毒性，实验中染色时间不宜过长，以免造成非特异杀伤。

二、其他方法

补体介导的细胞毒实验还可以用 MTT 显色法和靶细胞释放同位素法检测。在靶细

胞、抗体、补体作用后，可以加入 MTT，通过显色法测定细胞毒。另外，可以 ^{51}Cr 预先标记靶细胞，待靶细胞与抗体、补体作用后，死亡的靶细胞释放 ^{51}Cr 至上清，采用 γ 计数仪测量上清的 cpm 值，从而计算出细胞毒活性。

第四节　补体结合的相关实验

一、补体结合实验

补体结合实验是利用补体的免疫溶血作用作为指示系统，来检测另一反应系统抗原或抗体的试验。早在 1906 年 Wasermann 就将其应用于梅毒的诊断，即著名的华氏反应。

补体结合实验是一种有补体参与，并以绵羊红细胞和溶血素作为指示系统的抗原抗体反应。本反应的成分可分为两个系统，一为试验系统，即为已知抗原（或抗体）和待检抗体（或抗原）；另一个为指示系统，即 SRBC 和其相应的溶血素。待检抗原、抗体和先加入的补体作用后，再加入指示系统。若待检系统中的抗原与抗体相对应，两者特异性结合后激活补体并耗竭补体，再加入的指示系统无补体结合，不出现溶血，即为补体结合实验阳性；若待检系统中的抗原与抗体不对应或缺少一方，补体不被激活，当指示系统加入后，绵羊红细胞-溶血素复合物激活补体，产生溶血现象，即为补体结合实验阴性。

补体结合实验是一个经典的免疫学检测方法。其优点是具有较高的特异性和敏感性，曾应用于传染病诊断、抗原和抗体的检定等方面。其缺点是参与成分及影响因素多，操作非常繁琐，而且补体等试剂不稳定，因此在临床检验和科学研究中已被免疫黏附血凝实验所取代。

二、免疫黏附血凝实验

免疫黏附血凝实验是 20 世纪 60 年代发展起来的一种高度敏感性的免疫学技术，主要用于抗原、抗体的检测。其原理是免疫复合物激活补体，形成的 Ag-Ab-C4b2b3b 复合物能与具有黏附受体（C3b、C4b 受体）的指示细胞（如人 O 型红细胞）结合，并促使细胞发生凝聚。只要实验系统中存在微量的抗原、抗体，就能通过补体系统与红细胞结合，发生血凝。

免疫黏附血凝实验是一种高敏感度的免疫实验方法，其优点是操作简便，无需溶血素，也无需滴定补体，检验抗原、抗体的敏感性比补体结合实验高数百倍。常用于：①传染病诊断、病原性抗原及相应抗体的检测；②其他抗原的检测，如肿瘤相关抗原、血迹中的蛋白质鉴定、HLA 分型等；③自身抗体检测。

材料与试剂

5×巴比妥缓冲液：见 CH_{50} 检测

0.1mol/L EDTA-Na_3 原液：见 ACH_{50} 检测

2%明胶溶液：2.0g 明胶，100ml 双蒸水，加热溶解，4℃保存

明胶-巴比妥缓冲液（GVB^{2+}）：1000ml 5×巴比妥缓冲液，10ml 0.03mol/L $CaCl_2$，10ml 0.01mol/L $MgCl_2$，100ml 2%明胶溶液，补足双蒸水至 2000ml，调 pH 至 7.4

0.04 mol/L EDTA-GVB^{2+}：120ml 5×巴比妥缓冲液，400ml 0.1mol/L EDTA-Na_3 原液，50ml 2%明胶溶液，双蒸水补足至 1000ml

DTT（dithiothreitol，二硫苏糖醇）：用前以 0.04mol/L EDTA-GVB^{2+} 配制成 2mg/ml溶液

细胞抗原：一般配成 5×10^7 个/ml 悬液，如果是肿瘤细胞抗原，配成 1×10^6 个/ml悬液

抗血清：如果用抗体检测抗原，则正式实验抗血清用 5U/ml

补体：豚鼠血清，以 0.04mol/L EDTA-GVB^{2+} 稀释成 1∶50～1∶100

O 型人红细胞：生理盐水洗涤 3 次，再以 0.04mol/L EDTA-GVB^{2+} 洗一次，然后用该液配成 1.2%细胞悬液

待测血清：56℃热灭活 30min

步骤

1）用 GVB^{2+} 将待测血清做倍比稀释，浓度从 1∶10～1∶320，分别加入各试管中，每管 0.3ml。

2）将 0.3ml 抗血清和 0.3ml 1∶30 稀释的补体加入各试管中。

3）样品对照管：0.3ml 待测血清加入 0.6ml GVB^{2+} 液，不加抗血清；抗血清对照管：0.3ml 1∶30 稀释的补体中加入 0.6ml GVB^{2+} 液，不加待测血清。

4）各试管混匀，37℃水浴 30min。

5）各管中加入 0.1ml 1.2%人红细胞，混匀，振荡 10min，然后 37℃孵育 1h。

6）结果判定

（1）颗粒抗原：各管 500r/min 离心 10min，抗原-抗体-红细胞复合物下沉，未吸附的颗粒抗原漂浮于上清中，取上清 10μl 涂片镜检，计算抗原颗粒消失率。消失率≥50%为阳性。抗原颗粒消失率（%）＝［（对照管上清颗粒抗原数－待测管上清颗粒抗原数）/对照管上清颗粒抗原数］×100%

（2）可溶性抗原：与间接血凝实验判定方法一致，判定 50%凝集的最高血清稀释度。完全不凝：全部细胞沉积于管底中央，呈紧密圆点状，边缘整齐光滑；25%凝集：细胞下沉至管底，呈圆扣状，周围有隐约可见的轻度凝集；50%凝集：大部分细胞沉积至管底，周围有薄层凝集，边缘松散；75%凝集：细胞形成薄层凝集，边缘锯齿状，布满管底；100%凝集：细胞形成明显凝集块，布满管底，中央无圆盘状，边缘出现卷边。

（3）肿瘤抗原：取混合液涂片镜检，肿瘤细胞周围有 3 个以上细胞黏附呈花环状的细胞即为阳性细胞，计数 200 个肿瘤细胞，计算其阳性率。

注意事项

1）试管、吸管等器材和试剂都应清洁无菌。

2）实验中加入DTT是为了维持C3活性，消除血清中C3灭活因子的作用，尤其在反应血清浓度较高时需要使用DTT。DTT可用聚乙二醇替代。

3）补体中应避免加入对人红细胞成分反应的抗体。

第五节　补体成分的测定

补体系统由30多种分子组成，根据世界卫生组织（WHO）和国际免疫学会(IUIS)的建议，通常只需检测其中的C3、C4、C1q、B因子C1INH。

补体成分的测定方法可分为免疫溶血法和免疫化学法两种。免疫溶血法是依据抗原与抗体结合形成的免疫复合物激活补体经典途径，导致细胞溶解的效应。抗原为SRBC，抗体为抗SRBC的抗体，即溶血素。使用的补体有两种，一种是经灭活或缺乏某一补体成分的正常血清；另一种是待测样品的补体。实验中抗原、抗体与正常血清相作用而不能发生溶血，此时加入待测样本，补充了缺乏的补体成分，发生级联酶促反应，红细胞溶解，主要用于测定补体成分的活性。免疫化学法分为单向免疫扩散法、透射比浊法、火箭电泳法和ELISA方法等，常用于测定补体的含量。通过补体成分含量和活性的测定，可以判断补体某一成分的缺失或失活，为相关疾病的诊疗提供依据。由于某些补体具有多态性，表型与功能也不尽相同，因此补体活性与功能的测定不能互相取代，需要两者综合分析。

一、C4的测定

C4是补体经典激活途径的重要组成部分，由α、β、γ3条肽链经二硫键连接而成，分子质量为200kDa，为β1-球蛋白，在肝细胞和巨噬细胞中合成。

（一）C4含量的测定

C4含量的测定方法有多种，包括透射比浊法、单向扩散法和ELISA法等，目前最为常用的还是透射比浊法。其原理是血清中C4与抗C4抗体发生反应，两者比例合适时可形成可溶性免疫复合物。聚乙二醇能够沉淀该免疫复合物，使溶液的透光率（T）下降。免疫复合物的量与C4、抗C4抗体的量相关，如其中抗C4抗体浓度恒定，则免疫复合物形成量与样品中C4含量正相关，可通过检测溶液吸光度值判定样品C4含量。透射比浊法测定补体C4含量操作简捷、敏感度高，适用度广，可以用于其他补体成分含量的测定。

C4含量升高常见于风湿热的急性期、结节性动脉周围炎、皮肌炎、心肌梗死、Reiter综合征和各种类型的多关节炎等；降低则常见于自身免疫性慢性活动性肝炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、类风湿性关节炎、IgA肾病、亚急性硬化性全脑炎等。

材料与试剂

抗C4血清：已有商品化试剂出售，实验时按说明书要求配成最佳工作浓度

稀释液：40.0g聚乙二醇（PEG）6000，10.0g NaF，101.50g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，10.0g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$，1.0g NaN_3，补足双蒸水至1000ml。过滤，室温保存

细胞培养板
酶联检测仪

步骤

1）在 96 孔细胞培养板中分别加入稀释的抗 C4 血清 160μl、158μl、156μl、154μl、152μl、150μl、148μl，各做 3 个复孔，以 160μl 抗血清孔作为空白对照，将溶解的 C4 标准品分别以 2μl、4μl、6μl、8μl、10μl、12μl 加入其余相应各孔，最终体积均为 160μl。
2）在反应板的其余孔中加入稀释的抗 C4 血清，156μl/孔，然后每孔加入不同稀释度的待测血清 4μl，每个稀释度做 3 个复孔。
3）反应板振荡混匀 1min，37℃水浴 30min，用酶联仪测定其 OD_{490} 值。
4）选择 C4 标准品的各孔做标准曲线，以 C4 含量为横轴，OD 值为纵轴，绘制标准曲线。
5）依据标准曲线计算样品中 C4 含量。本法测得人 C4 血清含量正常值为 0.12～0.36g/L。

注意事项

1）所有试剂及器材都应清洁无菌。
2）PEG6000 作为非离子性亲水多聚体可以帮助抗原抗体复合物的形成。
3）工作溶液的 pH 为 6.5～8.0 为宜。
4）C4 抗原不能过量，否则会减少抗原抗体复合物的形成，导致光吸收减少，检测结果偏低。

（二）C4 活性的测定

C4 活性的测定采用免疫溶血法。用水合肼或氨水处理豚鼠血清去除其中的 C4，这种 C4 缺乏血清（R4）不能使致敏的 SRBC 溶解，当加入含有 C4 的受检血清后，级联酶促反应的发生即可导致致敏 SRBC 溶解。其溶血程度与待测血清中 C4 的活性呈正相关。

C4 活性测定原理是免疫溶血法，具体方法采用试管法，本方法操作简便，精确度较高，是最为常用的测定补体成分活性的方法。

材料与试剂

巴比妥缓冲液：见 CH_{50} 检测
SRBC：用巴比妥缓冲液洗涤 3 次，配成 5％细胞悬液
溶血素：按效价稀释成 4U/ml
豚鼠新鲜血清
待检血清
试管
水平离心机
酶联检测仪

步骤

1）致敏 SRBC：5%SRBC 与等量 4U/ml 溶血素混匀，37℃水浴 30min。

2）制备去 C4 血清（R4）：19 份豚鼠血清中加入 1 份 14%氨水，混匀，37℃水浴 30min，用 1mol/L 盐酸调 pH 至 7.2。

3）4ml 致敏 SRBC 中加入 0.25ml R4，混匀，室温 15min，即为 EAR4 液。

4）配制溶血标准管：100ml EAR4 液与 2.6ml 双蒸水混匀，成为全溶血管。取 2ml 全溶血管液加入 2ml 缓冲液，制成 50%溶血标准管。

5）取待检血清，稀释为 1∶150 血清。

6）按表 8-3 所示，在试管中依次加入各成分，混匀，37℃水浴 30min。

表 8-3 C4 溶血活性测定

管号	稀释血清/μl	巴比妥缓冲液/μl	EAR4/μl	管号	稀释血清/μl	巴比妥缓冲液/μl	EAR4/μl
1	5	95	100	6	50	50	100
2	10	90	100	7	60	40	100
3	20	80	100	8	70	30	100
4	30	70	100	9	80	20	100
5	40	60	100	10	—	100	100

7）结果判定：各试管中加入巴比妥缓冲液 25ml，混匀，室温 2000*g* 离心 10min，取上清，测 OD_{420} 值。确定引起 50%溶血的终点管（参见补体 CH_{50} 检测），计算 C4 溶血活性：C4 溶血活性（U/ml）＝（1/血清量）×稀释倍数。正常人血清 C4 溶血活性为（8.270±2.087）U/ml。

二、B 因子的测定

B 因子是补体旁路激活途径的重要成分，是由 733 个氨基酸组成的单链糖蛋白，分子质量为 95kDa，主要由肝脏和巨噬细胞合成。

（一）B 因子含量的测定

B 因子含量的测定方法有火箭电泳法、透射比浊法和 ELISA 法等免疫化学方法，本文介绍的是火箭电泳法。其原理是将单向免疫扩散和电泳相结合的一种定量检测技术。电泳时，含于凝胶中的抗体不发生移动，而抗原向正极泳动。当抗原与抗体分子比例适当时，形成一个状如火箭的不溶性免疫复合物沉淀峰，峰的高度与抗原浓度呈正相关。与同样条件下的已知浓度的抗原血清比较，即可求得待测血清的抗原含量。

B 因子含量升高常见于恶性肿瘤，含量降低常见于自身免疫性溶血性贫血、肝硬化、慢性肝炎和急性肾小球肾炎等。火箭电泳法检测精度高，但操作较繁琐、耗时较长。

材料与试剂

羊抗人 B 因子血清：可采购商品化试剂，按说明书所示稀释，配制含不同浓度抗体的琼脂糖凝胶板，选择峰高、清晰度适当的抗体浓度为最适工作浓度

电泳缓冲液（pH8.6）：称取 10.30g 巴比妥钠，1.83g 巴比妥，溶于 1000ml 双蒸水中

凝胶缓冲液：定量测定时用 1∶5 稀释的电泳缓冲液

染色液（0.25%考马斯亮蓝）：称取 0.25g 考马斯亮蓝 R-250，溶于 100ml 脱色液中

脱色液：200ml 甲醇、100ml 冰乙酸、700ml 蒸馏水

步骤

1）制备含抗 B 因子血清的 1%琼脂糖凝胶板：称取 0.5g 琼脂糖和 1.0g PEG6000，置 100ml 三角烧瓶中，加入 50ml 凝胶缓冲液，煮沸至琼脂糖完全溶解，55℃保温；加入抗 B 因子血清混匀，铺板，凝胶厚度约 1mm。沿设定的阴极端线约 2cm 处打孔，各孔间距 8mm，孔径约 3mm。

2）待测样本用凝胶缓冲液 1∶10 稀释，参考血清倍比稀释（一般做 5 或 6 个稀释度），每孔加 5～10μl。

3）将样本孔端接负极，电压 12.5V/cm，电泳 5h。

4）取出凝胶板，分别以生理盐水漂洗 2 次，去离子水漂洗 1 次。

5）将干净滤纸铺在凝胶板上，干燥、考马斯亮蓝染色、脱色。

6）结果计算：测量各火箭峰的高度，根据峰高-浓度标准曲线计算待测样本中 B 因子含量。

注意事项

1）加入抗体时要严格掌握琼脂温度，保证抗体活性。

2）应选择电渗作用最小的琼脂粉或优质琼脂糖来制备凝胶，不使用普通琼脂。

3）打孔结束，可先将琼脂板放在电泳槽上，低电流通电后再加样，加样后立即加大电流，这样可防止抗原液向孔四周扩散，使火箭峰形状良好，敏感性增加。

4）使用低电压、低离子强度、电泳时间长些，效果会更好。

（二）B 因子活性的测定

将 RRBC 加入正常人血清中，可使 B 因子活化，激活补体旁路途径致使 RRBC 溶解。将正常人新鲜血清加热使 B 因子丧失活性，旁路途径不能激活，当加入 RRBC 时不发生溶血。此时再加入含有 B 因子的待测血清，旁路途径即被激活，发生 RRBC 溶血反应。根据溶血程度可测定待测血清中 B 因子的活性。

B 因子活性的测定还是依据免疫溶血的原理，具体方法采用试管法，本方法操作简便，精确度较高，是最为常用的测定 B 因子活性的方法。

材料与试剂

巴比妥缓冲液原液和工作液：见旁路途径溶血活性测定

0.1mol/L EDTA

RRBC 悬液：见旁路途径溶血活性测定，配制成 3×10^{8} 个/ml 细胞悬液

参考血清：取新鲜正常人混合血清（3 人以上），以工作液按 1∶8 稀释

去B因子的血清（RB）：取新鲜正常人混合血清（3人以上），56℃水浴加热15min，灭活其中B因子，新鲜配制

待测血清

试管

分光光度计

步骤

1）将待测血清用工作液按1∶8稀释。

2）按表8-4所示，在试管中依次加入各成分，混匀，37℃水浴30min。

表8-4 B因子活性测定

管号	RB/ml	RRBC/ml	参考血清/ml	待测血清/ml
1	0.6	0.8	0.6	—
2	0.6	0.8	0.6	—
3	0.6	0.8	—	0.6
4	0.6	0.8	—	0.6

3）结果判定：取出试管，2000r/min离心10min，取上清，检测OD_{540}值。按公式计算B因子活性：待测血清B因子溶血活性（%）=（待测血清OD_{540}/参考血清OD_{540}）×100%。低于60%则判定为B因子活性降低。

注意事项

兔、豚鼠、羊红细胞都可用于B因子活性测定，但以RRBC最适合。

三、C3的测定

C3是补体系统中含量最多、最重要的一个组分，由α链和β链组成，是β-球蛋白，分子质量为180kDa，由巨噬细胞和单核细胞分泌，占总补体含量的1/3以上；也是补体经典和旁路激活途径的中心环节，具有重要的生物学功能，因此C3的研究在补体系统中占据关键地位。通常只测定C3的含量，即为可诸多相关疾病的诊断和治疗提供重要依据。

C3含量测定的方法有双抗体夹心ELISA法、透射比浊法和免疫电泳法等，本文介绍的是双抗体夹心ELISA法。将含C3的待测血清加入包被有鼠抗人C3单抗的酶标板，孵育后洗涤。再加入酶标记的羊抗鼠IgG，孵育后洗涤。再加入酶反应底物，形成的鼠抗人C3单抗-C3-酶标羊抗鼠IgG复合物，在酶的作用下，分解底物显色，颜色深浅与C3含量正相关。

C3的增多与减少与总补体活性相似，且更为敏感。在机体组织损伤和急性炎症时，C3含量常增高，如菌血症、肺炎、扁桃腺炎、结核、伤寒、麻疹、流脑等；肿瘤患者，尤以肝癌，血清C3含量升高更为显著，但胰腺癌晚期与隐性淋巴细胞白血病则呈降低趋势。

C3含量降低可见于以下原因：①补体成分消耗增加，如血清病、链球菌感染后的肾小球肾炎、全身性系统性红斑狼疮、冷球蛋白血症、自身免疫性溶血性贫血、类风湿

性关节炎、器官移植后的排斥反应；②补体大量丢失，多见于肾病综合征或大面积烧伤、外伤、手术等；③补体合成不足，主要为肝病患者，如肝硬化、慢性活动性肝炎和急性肝炎的重症病例。

材料与试剂

鼠抗人 C3 单抗
人 C3 标准品
辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠 IgG
牛血清白蛋白（BSA）
洗涤液（PBS-T，pH7.4）：0.20g KH_2PO_4，2.90g Na_2HPO_4，8.00g NaCl，0.5ml Tween20，加双蒸水至 1000ml
待测血清
酶联检测仪

步骤

1）用含 0.5%BSA 的洗涤液稀释待测血清。
2）用鼠抗人 C3 单抗包被酶标板，洗涤，拍干。
3）加入待测血清，37℃温育 1h，洗涤，拍干。
4）加入酶标羊抗鼠 IgG（1∶2000），37℃温育 1h，洗涤，拍干。
5）加入底物溶液（OPD），避光保存 30min。
6）加入 2mol/L 硫酸终止反应。
7）检测 OD_{492} 值。用 C3 标准品制作标准曲线，测定待测血清中 C3 含量。

注意事项

1）洗涤过程非常重要，不充分的洗涤易造成假阳性。
2）一次加样时间最好控制在 5min 内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
3）如标本中待测物质含量过高，先稀释后再测定，计算时最后乘以稀释倍数。
4）每次测定的同时做标准曲线，需要做复孔。
5）底物避光保存。

四、C1q 的测定

C1q 分子质量为 39kDa，由 6 个相同的亚单位组成对称的六聚体，当两个以上的 C1q 与免疫复合物中的 IgM 或多个 IgG 的 Fc 段结合后，C1q 构型发生改变，导致 C1r 和 C1s 的相继活化，启动补体经典激活途径。C1q 含量的测定过去常采用单向扩散法，近年来多采用双抗体夹心 ELISA 法，也可以用透射比浊法。人血清 C1q 含量正常值为 (0.197±0.04)g/L。C1q 含量增高常见于骨髓炎、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮 (SLE)、血管炎、硬皮病、痛风、活动性过敏性紫癜。C1q 含量降低常见于活动性混合性结缔组织病。

五、C1INH 的测定

C1 酯酶抑制剂（C1INH）是血清中高度糖基化的一种补体调节蛋白，为单链分

子，由 478 个氨基酸残基组成，分子质量为 104kDa，主要在肝脏中合成。C1INH 与活化的 C1r 或 C1s 结合形成稳定的复合物而导致 C1 丝氨酸蛋白酶失活。C1INH 含量的测定常采用透射比浊法和双抗体夹心 ELISA 法，人血清 C1INH 含量正常值约为 220mg/L。C1INH 含量下降或缺失会引起血管神经性水肿。

第六节　补体遗传多态性的检测

补体的遗传多态性（genetic polymorphism）是指在同一集群中，两个或两个以上非连续性突变体或基因型，以极小的频率有规律地同时发生的现象。目前已从 4 个水平对补体多态性进行了研究：①血清中天然补体成分同种型的分析（表型水平）；②确定同种型的亚单位组成（亚表型水平）；③同种异型的频率和各个基因/等位基因的频率与分离；④补体 DNA 水平的定位和测序。现已发现许多补体分子具有多态性，其中以 C2、Bf、C4、C3 和 C6 最为显著。

补体遗传多态性的检测分两步进行：第一步是将抗凝血浆行蛋白质电泳或等电聚焦电泳，根据分子质量、电荷量或等电点（pI）的差异区分血浆内各蛋白质；第二步是免疫固定或溶血鉴定。免疫固定法就是在电泳后，在凝胶板上铺布含抗补体成分的抗血清，形成镶嵌在凝胶孔中的免疫复合物沉淀。将固定后的凝胶在生理盐水中漂洗，除去杂质。干燥后，考马斯亮蓝染色。对比国际补体定型标准品，判定待测样本补体的同种异型。溶血法是将致敏 SRBC 与缺失某一补体成分的血清混合，铺布在电泳后的凝胶板上，凝胶板上的待测补体成分可补充缺乏的成分，发生酶促反应，产生溶血，板上可出现待测样本缺失补体成分的溶血带。

一、C4 遗传多态性的检测

补体 C4 基因位于第 6 号染色体短臂，与 C2、B 因子紧密连锁，有 C4A、C4B 两个基因座，两者均表现出高度的遗传多态性。C4 是补体系统中遗传多态性最丰富的成分，现已发现 40 余种同种异型体。C4 遗传多态性在物种起源、法医鉴定及与疾病相关的研究领域受到极大的重视。C4 遗传多态性的检测方法可分两种，一种是聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳加免疫固定；另一种是等电聚焦电泳后加溶血覆盖。

（一）等电聚焦电泳及免疫固定技术检测 C4 遗传多态性

本方法常应用于人类种间差异研究、法医鉴定和相关遗传疾病的机制研究。本方法是国际通行的研究方法，分辨率高，检测精度高，适于自动化分析，简便易行，是 C4 遗传多态性检测的主流方法。

材料与试剂

羧肽酶 B（carboxypeptidase type Ⅰ：10mg/ml。将羧肽酶 B 分装于微量离心管中，每管 15μl，－20℃冻存，临用时取出一管加入 100mmol/L NaCl 至 80μl

神经氨酸酶（neuraminidase type Ⅵ：将 250μl 0.2mol/L EDTA 加入盛有神经氨酸酶的瓶中，－20℃冻存。临用时 7.5μl EDTA 抗凝血浆加 2μl 神经氨酸酶

透析缓冲液（pH6.8）：84.8g NaH_2PO_4，66.2g Na_2HPO_4，25.0g EDTA-Na_4，加双蒸水至10L

抗C4血清，临用前按1∶4或1∶2稀释

Acrylsol A：33.3g牛磺酸，66.6g丙烯酰胺，1.6g双丙烯酰胺，加双蒸水至1L，过滤，储于棕色瓶中4℃保存

5×VBS（pH7.3）：1.02g巴比妥钠，8.30g NaCl，加3.46ml 1mol/L HCl，补足双蒸水至200ml

2%明胶：2.0g明胶，0.02g叠氮钠溶于100ml双蒸水中，4℃保存

GVB^{2+}（明胶巴比妥缓冲液）：20ml 5×VBS，2ml 0.03mol/L $CaCl_2$，2ml 0.1mol/L $MgCl_2$，10ml 2%明胶，加双蒸水至100ml

GL-GVB^{2+}：GVB^{2+}与10%葡萄糖溶液等量混合

PB（pH6.0）：13.17g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$，1.86g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，加双蒸水至1L

PBS（pH6.0）：980ml 0.85%NaCl，20ml PB（pH6.0）

5×10^{-5}mol/L I_2溶液：先配制10^{-2}mol/L I_2溶液（称取8.3g KI，0.25g I_2，加4ml pH6.0的PBS，待I_2溶解后，再加100ml PBS），取5ml 10^{-2}mol/L I_2加到995ml PBS中

0.2mol/L磷酸：取1.35ml磷酸，加双蒸水至100ml

0.2mol/L乙醇胺：取1.22ml乙醇胺，加双蒸水至100ml

0.001%核黄素：称取10mg核黄素，加双蒸水至1L，于棕色瓶中4℃保存

1%曲拉通：取10ml Triton X-100，加蒸馏水990ml

两性电解质（ampholine，LKB）

脱色液：200ml甲醇，100ml冰乙酸，加双蒸水至1L

染色液：3.02g考马斯亮蓝，加脱色液至1L

等电聚焦系统

扫描系统

步骤

1）取7.5μl EDTA抗凝血浆与2μl神经氨酸酶、3μl羧肽酶B混合。对透析缓冲液4℃透析过夜。

2）制胶和等电聚焦电泳参见第二十一章蛋白质电泳和鉴定技术。

3）将抗C4血清1∶2或1∶4稀释，均匀铺在电泳完毕的凝胶上，37℃孵育30～45min，然后放入生理盐水中漂洗过夜，中间更换一次漂洗液。漂洗后，将一层滤纸铺在凝胶板上，上方放置吸水纸，待凝胶中水分吸干后放37℃烘干，然后放入0.3%考马斯亮蓝染色液中染色1h，再放入脱色液中脱色，直至背景清晰为止。

4）依照第11届国际组织定型会议分型标准或将待测样本与C4分型标准血清比较，判断待测样本的同种异型。

注意事项

1）神经氨酸酶的作用主要是去除唾液酸，羧肽酶 B 能切除分子 β 链 C 端的碱性氨基酸。
2）透析过程中应注意更换缓冲液，每 4h 更换一次透析液。
3）在聚丙烯酰胺等电聚焦凝胶中，高分子质量蛋白质（≥750kDa）常常表现异常的迁移行为，琼脂糖凝胶或琼脂糖-丙烯酰胺凝胶较适用于高分子质量蛋白质。
4）考马斯亮蓝染色时，三氯乙酸固定后用含 0.25％SDS 的乙醇：乙酸：水(33：10：57)溶液洗涤凝胶 10～30min 可以进一步改善染色效果。SDS 同载体两性电解质结合后可以更好地去除载体两性电解质。

（二）溶血覆盖法检测 C4 遗传多态性

用肼处理豚鼠血清，灭活其补体成分 C4。将 C4 缺乏的血清与致敏的 SRBC 混合，因缺乏 C4，不能完成酶促反应，将混合物与一定浓度琼脂糖混合倾注在电泳完毕的凝胶板上，凝胶板上 C4 成分补偿了使混合物中的 C4，发生溶血反应，凝胶板上 C4 条带区可出现透明溶血带。C4B 的溶血活性较 C4A 高，先发生溶血反应，因此可用此法区分 C4A 与 C4B。

溶血覆盖法相对免疫固定法来说，操作较为复杂、繁琐，只有在 C4A 和 C4B 基因难以区分的情况下才使用本法。

材料与试剂

主要试剂见补体溶血活性 CH_{50} 测定

R4 豚鼠血清的制备：取 1ml 正常豚鼠血清加 0.1ml 0.16mol/L 的水合肼，37℃，2h

步骤

1）取 5ml SRBC 用生理盐水漂洗 3 次，用 GVB^{2+} 配成 10％的浓度。
2）取 5ml 10％SRBC 加 50ml 0.2mol/L EDTA 和 5ml 6U/ml 的溶血素混合，37℃水浴 30min。期间注意经常摇匀，使抗原与抗体分子充分接触，然后用生理盐水洗 2 次，GVB^{2+} 洗 1 次。
3）制胶和电泳待测样品（参见第二十一）。
4）选择与凝胶板大小适宜的玻璃板，厚度约为 1mm，压在电泳完毕的凝胶板上，将凝胶压平以利含血琼脂糖均匀分布。
5）用 GVB^{2+} 配制 1％的琼脂糖，煮沸，待琼脂糖完全溶解后置 50℃水浴。再加入 1.5ml 步骤 2）制备的 SRBC 与 1.5ml R4 豚鼠血清，混匀，倾注在凝胶板上。
6）37℃孵育约 10min，直至观察到 C4B 溶血带出现且清晰为止。用 1％戊二醛固定，PBS 漂洗，干燥保存。

二、C2 遗传多态性的检测

人类补体 C2 基因位于第 6 号染色体短臂的 HLAIII 区，与 B 因子紧密连锁。C2、

B 因子、C4 共同构成补体单倍型，C2 的缺乏可导致一些疾病的发生。C2 的遗传多态性主要为 C2*C（C：common）、C2*B（B：basic）、C2*A（A：acidic）、C2*QO（QO：quantify zero）4 种同种异型。

人的 C2 主要由 3 个等位基因（C2A、C2B 和 C2C）所编码。在补体成分的缺陷中，C2 的遗传性缺陷所占比例较高，为常染色体共显性遗传。C2 缺陷者发生免疫复合物病及 SLE 的危险性较大。

C2 遗传多态性的检测方法与 C4 相近，同样可以采用电泳（高压电泳或等电聚焦电泳）加免疫固定法或溶血覆盖法。样本不需经神经氨酸酶和羧肽酶 B 处理，直接加入经 EDTA 处理的抗凝血清样品检测。两种检测方法都与 C4 检测相似，不同的是 C4 溶血覆盖用的是 R4 豚鼠血清，C2 溶血覆盖用的是 R2 人血清。

三、B 因子遗传多态性的检测

B 因子基因位于第 6 号染色体短臂的 HLA III 区，B 因子的遗传多态性最常见的表型为 S（slow）和 F（fast），另外有近 20 种罕见型。B 因子的多态性与某些自身免疫病和感染性疾病，如 SLE、癫痫、胰岛素非依赖型糖尿病等疾病相关。B 因子遗传多态性的检测方法与 C4、C2 类似，同样可以采用电泳（高压电泳或等电聚焦电泳）加免疫固定法或溶血覆盖法。

（张　意）

参考文献

沈关心，周汝麟，王庆．2002．现代免疫学实验技术．第二版．武汉：湖北科学技术出版社．301～316．

朱立平，陈学清，张建中．2000．免疫学常用实验方法．北京：人民军医出版社．119～133．

Ad'hiah A，Papiha S．1996．Complement components C2，C3，and C4（C4A and C4B）and BF polymorphisms in populations of the Indian subcontinent．Hum Biol，68（5）：755～756．

Carroll MC．2008．Complement and humoral immunity．Vaccine，26 Suppl 8：128～133．

Chung E，Wu Y，Yang Y，et al．2005．Human complement components C4A and C4B genetic diversities：complex genotypes and phenotypes．Curr Protoc Immunol，Chapter 13：Unit 13．8．

Komotar RJ，Starke RM，Arias EJ．2009．The complement cascade：new avenues in stroke therapy．Curr Vasc Pharmacol，7（3）：287～292．

Lachmann PJ，Smith RA．2009．Taking complement to the clinic-has the time finally come．Scand J Immunol，69（6）：471～478．

Liszewski MK，Fang CJ，Atkinson JP．2008．Inhibiting complement activation on cells at the step of C3 cleavage．Vaccine，26 Suppl 8：122～127．

Perry VH，O'Connor V．2008．C1q：the perfect complement for a synaptic feast．Nat Rev Neurosci，9（11）：807～811．

Sjöberg AP，Trouw LA，Blom AM．2008．Complement activation and inhibition：a delicate balance．Trends Immunol，30（2）：83～90．

Yamamoto S，Kubotsu K，Kida M，et al．1995．Automated homogeneous liposome-based assay system for total complement activity．Clin Chem，41（4）：586～590．

第九章　细胞因子及细胞因子受体

细胞因子是由各种细胞产生的、介导细胞之间相互作用的多功能蛋白质或糖蛋白，参与调控机体的免疫应答、炎症反应、造血功能，乃至胚胎发生、生长发育等各个方面。细胞因子或其受体的异常增多、减少，异常分布或细胞因子网络失衡常常与疾病相关。研究细胞因子的作用机制、细胞因子之间的关系、细胞因子与细胞的相互作用、细胞因子在生理过程中的地位及其对疾病的发生、发展和转归的影响，以及研究和开发细胞因子在治疗与诊断疾病方面的应用等，已经成为当今科学研究的热点。

细胞因子及其受体的检测和研究方法主要包括三大类：①用生物学活性检测法检测和研究细胞因子的生物学活性。②用免疫标记技术检测和研究细胞因子及其受体蛋白的存在和含量。例如，用免疫酶技术（ELISA 等）、放射免疫技术或发光免疫技术检测各种液相中的细胞因子或可溶性受体的含量（参见第十三章至第十五章），用流式细胞仪检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十五章），用 Western 印迹检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十一章和第二十二章），用免疫组织化学方法定位研究细胞因子或其受体在组织中的分布（参见第二十七章）。③用分子生物学方法检测和研究细胞因子及其受体 mRNA 的存在和含量，以及对细胞因子及其受体基因进行修饰和体内外研究。例如，用 RT-PCR 和定量 RT-PCR 技术检测各种细胞表达细胞因子或其受体 mRNA 的情况（参见第十七章），用 RNA 干扰技术研究细胞因子或其受体的表达变化（参见第十九章），用基因敲除或基因转入的方法研究细胞因子或其受体的功能（参见第三十四章和第三十五章），以及细胞因子或其受体的基因克隆和体外表达（参见第十八章）。最近有用蛋白质芯片或基因芯片等技术大规模研究细胞因子蛋白质或 mRNA 表达。另外，制备细胞因子及其受体抗体的技术（参见第七章）、蛋白质电泳和蛋白质相互作用（参见第二十一章至第二十三章）、信号转导研究技术（参见第二十八章）、共聚焦显微镜技术（参见第二十九章）等均可用于研究细胞因子或其受体。由于后两类研究方法在相关章节中已有详细介绍（只要将细胞因子及其受体看成是一种蛋白质或 mRNA 即可），为避免重复，本章主要介绍细胞因子及其受体的生物学活性的检测和研究方法。

细胞因子在细胞内合成，然后分泌出细胞。由于某些细胞因子由特定细胞亚群合成和分泌，所以检测细胞内细胞因子常用于判断某些特点细胞亚群的情况。例如，Th1 细胞表达 IFN-γ、Th2 细胞表达 IL-4、Th17 细胞表达 IL-17 等。虽然可通过检测这些细胞培养上清中相应细胞因子的量从而了解细胞的存在，但直接检测细胞内细胞因子的表达，可更精确地定性和定量细胞。本章还介绍了细胞内细胞因子的检测和研究方法。

第一节　概　　述

根据细胞因子的生物化学特点和生物学功能，可以将细胞因子分为 6 个大家族：白细胞介素（interleukin，IL）、干扰素（interferon，IFN）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、集落刺激因子（colone stimulation factor，CSF）、趋化因子（chemokine）和促生长因子。表 9-1 列出了主要细胞因子的一般特性，供研究者参考。

表 9-1　人类细胞因子的一般特性及标准品

细胞因子	相对分子质量×10^3	氨基酸数	等电点（pI）	糖基化位点	二硫键数目	mRNA /kb	标准品编号	标准品保存地点
IL-1α	17.5	153（159）	5.2～5.4	—	—	2.1	86/632	NIBSC
IL-1β	17.5	153	6.8	—	—	1.6	86/680，86/552	NIBSC
IL-1ra	25	152	4.0～5.5	+	—	1.8		
IL-2	15～17.5	133	6.6～8.2	+	1	0.9	86/654，86/504	NIBSC
IL-3	15～17	133	4～8	+	1	1.0	91/510，88/780	NIBSC
IL-4	15～20	129	10.4	+	3	0.9	88/656	NIBSC
IL-5[a]	18	115	4.9～5.1	+	1	0.9	90/586	NIBSC
IL-6	19～28	184	5.0	+	2	1.3	88/514，89/548	NIBSC
IL-7	22～25	152	9.0	+	3	1.8，2.4	90/530	NIBSC
IL-8	8	72	8.0～8.5	—	2	1.8	89/520	NIBSC
IL-9	25～40	126	10.0	+	+	0.7	91/678	NIBSC
IL-10[a]	35～40	160	8.0	+	2	1.0，1.5	92/516	NIBSC
IL-11	23～24	178	11.7	—	—	1.3，2.6	92/788，92/522	NIBSC
IL-12[b]	40，35	306，197	4.5～5.5	+	+	2.4，1.4		
IL-13	17	114		+		1.3		
IL-14	53	483	6.7～7.8	+		1.8		
IL-15	14～15	114		+	2			
IL-16[c]	50～60	130	9.1	+	+	2.6		
IL-17	28，31	155		+		1.2		
IL-18	18.3	157		—		1.1		
IFN-α	19～29	165/166	5.0～7.0	+	2	1.0～2.0	69/19	NIBSC
IFN-β	20	166	7.8～8.9	+	2	0.7	Gb23-902-531	NIAID
IFN-γ[a]	20～25	127～143		+	—	1.2	Gg23-901-530	NIAID
TNF-α[d]	17	157	5.6	—	1	1.7	87/650	NIBSC
TNF-β[d]	20～25	171（148）	5.8	+	—	1.35	87/640	NIBSC
LT-β	25～33	171	5.25	+	—	0.9～1.0		
TGF-α	5	50		+	3	4.5～4.8		

续表

细胞因子	相对分子质量×10³	氨基酸数	等电点（pI）	糖基化位点	二硫键数目	mRNA /kb	标准品编号	标准品保存地点
TGF-β[a]	11.5～12.5	112		－	4	2.5～5.8	89/514，90/696	NIBSC
GM-CSF	18～32	127	3.4～4.5	＋	2	0.7	88/646	NIBSC
G-CSF	32	174	5.5～6.1	＋	2	1.6	88/502	NIBSC
M-CSF[a]	45～90	150～192	3～5	＋	3	1.6～4.0	88/512	NIBSC
EPO	34～36	165	9.0（4.0～5.0）	＋	2	1.6	87/684	NIBSC
MCP-1	15	76	10.6	＋	2	0.7		
MIP-1	8～12	70	4.5	－	2	0.8	92/518	NIBSC
RANTES	8	69	9.5	－	2	1.1	92/520	NIBSC
Onco M	20～36	202（196）	＞9.5	＋	2	2.0		
SCF	20～36	164～165	5.0	＋	2	6.0	91/682，92/514	NIBSC
MIF	12			＋		0.7		
LIF	32～45	179	9.0	＋	3	4.2	91/602	NIBSC
PDGF[e]	28	74/86	10	＋	＋	2.8，3.5		
aFGF[f]	16	155/140		－		4.2[f]		
bFGF[f]	16	155/146	9.6	－		7.0[f]	90～712	NIBSC
EGF	6	53	4.6	－	3	4.75		
VEGF[a]	18	121/165	8.0	＋	＋			
NGF-β[a]	13.5	120	9.3	＋	3		93/556	NIBSC
CNTF	23			－		1.2		
IGF	6			＋		6.0		
HGF[b]	69，34			－		1.2		

a. 寡二聚体；b. 二硫键连接的异二聚体；c. 相对分子质量为14 000的蛋白质的同源四聚体；d. 三聚体；e. 二硫键连接A链和B链的同源二聚体或异二聚体；f. 有多种不同形式。

IL：白细胞介素（interleukin）；IFN：干扰素（interferon）；TNF：肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor）；LT：淋巴毒素（lymphotoxin）；TGF：转化生长因子（transforming growth factor）；GM-CSF：粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte and macrophage colony-stimulating factor）；G-CSF：粒细胞集落刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor）；M-CSF：巨噬细胞集落刺激因子（macrophage colony-stimulating factor）；EPO：促红素（erythropoietin）；MCP：单核细胞趋化蛋白（monocyte chemotactic protein）；MIP：巨噬细胞炎症蛋白（macrophage inflammatory protein）；RANTES：正常T细胞活化表达和分泌调节物（regulated on activation，normal T expressed and secreted）；Onco M：癌基因抑制蛋白M（oncostatin M）；SCF：干细胞因子（stem-cell factor）；MIF：巨噬细胞移动抑制因子（macrophage migration inhibition factor）；LIF：白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor）；PDGF：血小板衍生的生长因子（platelet-derived growth factor）；aFGF：酸性成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，acidic）；bFGF：碱性成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，basic）；EGF：上皮细胞生长因子（epidermal growth factor）；VEGF：血管内皮细胞生长因子（vascular endothelocyte growth factor）；NGF：神经生长因子（nerve growth factor）；CNTF：睫神经营养因子（ciliary neurotrophic factor）；IGF：胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor）；HGF：肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor）。

用不同的方法可以研究细胞因子的表达、含量及生物学活性。包括用 Western 印迹和定量 RT-PCR 的方法检测细胞表达细胞因子 mRNA 的水平，用 ELISA 方法检测血清、体液、培养液等各种液相中细胞因子的蛋白质含量，用 ELISPOT 和流式细胞仪等方法检测产生细胞因子的细胞，以及用各种生物学方法定量研究细胞因子的生物学活性。

值得注意的是，在比较评价不同方法检测的细胞因子 mRNA 水平、蛋白质含量或生物学活性的结果时应当十分慎重。因为细胞因子 mRNA 表达水平的高低并不一定代表其蛋白质含量也相应发生变化。例如，某些细胞因子的 mRNA 表达水平并未增加，但由于不同因素影响了 mRNA 的降解，使 mRNA 半衰期延长，翻译的细胞因子蛋白质增多。又如，细胞因子 mRNA 表达虽然增加，但 mRNA 的降解也增加，翻译的细胞因子蛋白质并未相应增加。同样，细胞因子蛋白质含量的增加或减少也并不一定表示其生物学活性有相应改变。因为 ELISA 方法检测的仅仅是细胞因子蛋白质，一些无活性蛋白质同样能被检出。真正反映细胞因子活性状态的应当是由生物学活性检测法测出的结果。因此，应根据不同的目的选用不同的方法，最好用几种方法检测同样的样品，比较所得结果可以了解更多的信息。

生物活性检测法检测细胞因子在生物体内的活性状态，如促进或抑制细胞生长、细胞毒性、抗病毒作用、诱导细胞趋化运动、诱导细胞生长并形成集落、诱导细胞表达膜分子、刺激细胞分泌其他细胞因子或其他分子等。由于一种细胞因子常常具有多种生物活性，而不同细胞因子又可能有相似的生物活性，所以在选择生物学活性的检测方法时，应当选择最能反映该细胞因子生物学作用的方法（如用抗病毒实验检测 IFN 的生物学活性、用细胞毒实验检测 TNF 的生物学活性等），或者根据实验需要选择适当的方法。还应考虑到待测样品中可能存在的其他有类似生物学活性的细胞因子的效应并且加以区分。一般来说，使用特异性中和抗体是区分不同细胞因子生物学活性的最可靠的手段。生物样品中可能存在一些细胞毒性物质毒杀靶细胞从而影响检测结果，进一步用连续梯度稀释的方法通常可以发现和排除这些干扰因子。生物样品中还可能有某些能干扰细胞因子与受体结合的物质，影响生物活性检测法的结果，如可溶性细胞因子受体、细胞因子结合蛋白、细胞因子抑制物或受体拮抗剂等，应当引起注意，特别是在实验结果与预期结果不同时要考虑到这些可能性。

定量细胞因子蛋白质或生物学活性时，先要建立一个细胞因子的实验室参考标准品，即用国际标准制剂或国际参考标准制剂标定一个实验室参考标准品，在以后的实验中即可用实验室参考标准品来标定每一次实验，使实验标准化。国际标准制剂或国际参考标准制剂可从美国国家过敏性和传染性疾病研究所（NIAID，National Institute of Allergy & Infections Diseases，Bethesda，Maryland，USA.）、英国国家生物学标准和控制研究所（NIBSC，National Institute for Biologic Standards & Control，Blanche Lane，South Mimms，Potters Bar，Herts，UK.）或美国国家癌症研究所（NCI，National Cancer Institute，Frederick，Maryland，USA.）获得（表 9-1）。

细胞因子通过结合细胞表面的相应受体，发挥其生物学效应。根据结构特征，可将细胞因子受体分为 5 个大家族（图 9-1）。

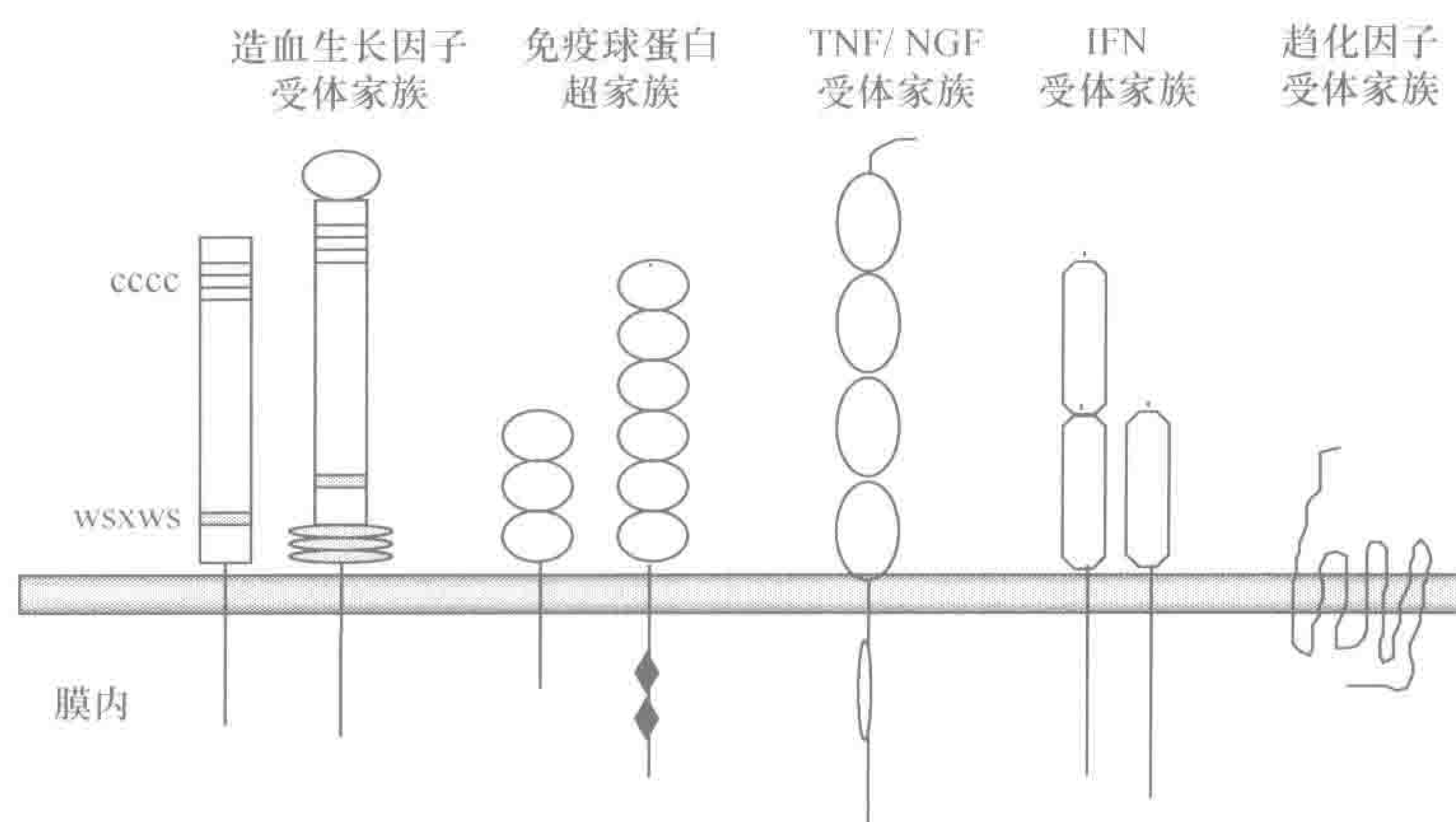


图 9-1　细胞因子受体家族示意图

cccc 代表此处为 4 个半胱氨酸（c）；wsxws 代表此处为 wsxws 结构

检测和研究细胞因子受体不但能阐明细胞因子的作用机制，而且有助于研究和开发细胞因子的类似物或拮抗剂用于临床。细胞因子受体包括位于细胞表面的膜表面受体和在体液中的可溶性细胞因子受体。膜表面受体介导细胞因子的生物学作用，可溶性受体大多竞争性抑制细胞因子的作用，但也有其他功能。细胞因子受体的研究主要针对膜表面受体。而可溶性受体的检测和研究方法与研究细胞因子的免疫标记方法及分子生物学方法相同。

第二节　白细胞介素

一、白细胞介素及其他细胞因子调节细胞生长的检测

细胞因子最重要的生物学活性之一是调节细胞的生长和分化，检测细胞因子调节细胞生长活性的方法也是检测细胞因子生物学活性的主要方法之一。细胞因子调节细胞生长的作用包括诱导增殖和抑制生长两方面，无论检测哪方面的生物学活性都需要有培养方便、敏感性强、特异性高的细胞株，简便、快速、准确、重复性好的测定细胞数的方法，可靠的标准品对照，才能获得稳定可靠的、可比较的结果。检测各种细胞因子的依赖细胞株和标准的检测细胞数的方法已经非常成熟，这些方法的操作过程基本相同，在这里一并介绍。

许多细胞因子具有促进细胞增殖的作用。例如，IL-2 能诱导 T 细胞和自然杀伤（NK）细胞增殖，IL-4 能诱导 B 细胞、NK 细胞和 T 细胞增殖，IL-1 能诱导 T 细胞增殖分化。另一些细胞因子（如 TNF、LT、IFN 和 TGF-α 等）具有抑制细胞生长（cytostatic）的活性。细胞因子在体外促进或抑制细胞生长的活性与实验中细胞因子的浓度、作用时间、靶细胞种类、靶细胞密度，以及环境中是否存在其他活性物质等因素有关。目前，常用一些必须依赖细胞因子才能生长的细胞株作为检测细胞因子促进细胞增殖活性的靶细胞（表 9-2）。这些细胞株的生长需要相应细胞因子的持续存在，表 9-3 列

出它们的培养和传代条件。由于这些细胞株大多不只对一种细胞因子反应，所以应当在试验中都用中和抗体来区分细胞因子。

表 9-2 检测细胞因子促进细胞增殖活性的常用细胞株

细胞因子	细胞株	敏感性	其他敏感细胞因子
IL-1	D10S	0.1～100pg	IL-2
IL-2	CTLL-2	1～700pg	IL-4，IL-15，TGF-β1，TGF-β2
IL-3	MO-7e	50pg～100ng	GM-CSF，SCF，IL-9，IL-15；（TNF，IFN-α，TGF-β）
IL-4	CT. h4S	2pg～1ng	IL-2；（TNF-α，TGF-β，IFN-α）
	CCL-185	5pg～1ng[a]	IL-13，IL-1，TNF-α，IFN-α
IL-5	TF-1	10pg～2ng	IL-3，IL-4，IL-6，IL-13，GM-CSF，NGF，SCF，LIF，EPO，Onco M，CNTF；（TGF-α，IFN-α，TNF-α）
IL-6	B9	2～50pg	IL-13，IL-11
IL-7	2bx	0.1～50ng	
IL-9	MO-7e	0.5～10ng	同 IL-3
IL-10	MC-9	0.5～100ng	IL-5
IL-11	B9-11	10～100pg	IL-6
IL-12	KIT-225	2pg～1ng	IL-2，IL-4
IL-13	B9.1.3	0.3～20ng	IL-6，IL-11
	TF-1	0.1～10ng	同 IL-5
IL-15	CTLL-2	0.02～1ng	同 IL-2
GM-CSF	MO-7e	5pg～1ng	同 IL-3
G-CSF	GNFS-60	5pg～1ng	IL-6，TGF-α，M-CSF，LIF，IL-13，Onco M
M-CSF	MNFS-60	0.1～10ng	IL-6，TGF-α，M-CSF，LIF，IL-13，Onco M
SCF	MO-7e	1～100ng	同 IL-3
LIF	DA-1a	1～100ng	G-CSF
TPO	MO-7e	5～100ng	同 IL-3
	32D/Mpl^{+}		
EPO	UT-7/EPO	0.2～10ng	TGF-α
Onco M	A375	0.01～1ng[a]	IL-1，IL-6，LIF，TNF-α，TGF-α
	TF-1	0.01～10ng[a]	同 IL-5
TGF-β	MuLv1	5pg～1ng[a]	TNF-α
	TF-1	0.001pg～1ng[a]	同 IL-5
TNF-α/-β	KYM-1D4	5pg～1ng[b]	无
	WEHI-164	1pg～1ng[b]	
CNTF	BAF-LRgpCR	1pg～1ng	LIF，Onco M
RANTES	THP-1	2pg～1ng[c]	MIP-1α，MCF-1，MCF-2，MCF-3
MIP-1	THP-1	2～100ng[c]	同 RANTES
MCF-1，2，3	THP-1	0.02～100ng[c]	同 RANTES

a. 增殖抑制试验；b. 细胞毒试验；c. 趋化试验。括号中的细胞因子抑制该靶细胞增殖。

TPO：促血小板生成素（thrombopoietin）；MIP：巨噬细胞炎症蛋白（macrophage inflammatory protein）；MCF：单核细胞趋化因子（monocyte chemotactic factor）；其他参见表 9-1 的注解。

表 9-3　常用细胞株的传代培养条件和检测条件（参考 Mire-Sluis and Thorpe 1998）

传代培养条件				检测条件		
细胞株	培养液[1]	FCS/%[2]	依赖细胞因子浓度	分瓶[3]	浓度/（个/ml）[4]	培养时间/h
BAF-LRgpCR	A	5	5ng/ml CNTF	1∶5	1×10^5	44
B9	A	5	50pg/ml IL-6	1∶6	5×10^4	96
B9-11	A	5	1ng/ml IL-11	1∶5	5×10^4	96
B9.1.3	A	5	50ng/ml IL-13	1∶6	5×10^4	96
CT.h4S	A	10	10ng/ml IL-4	1∶4	1×10^5	44
CTLL-2	A	10	200ng/ml IL-2	1∶10	1×10^5	18
DA-1a	A	10	1ng/ml LIF	1∶5	1×10^5	44
D10S	A	5	10～100pg/ml IL-1	1∶5	1×10^5	44
GNFS-60	A	5	2ng/ml G-CSF	1∶10	1×10^5	18
KIT-225	A+	10	20U/ml IL-2	1∶5	2×10^5	72
KYM-1D4	A	7		1∶20	2×10^5	72
MC-9	A+	10	200pg/ml 小鼠 GM-CSF	1∶4	2×10^5	44
MO-07e	A	5	1000U/ml M-CSF	1∶3	5×10^5	44
MV-3D9	A	5	2.5ng/ml GM-CSF	1∶6	5×10^3	120
PB1	B	15	50ng/ml IL-7	1∶5	5×10^5	44
TF-1	A	5	1ng/ml GM-CSF	1∶4	1×10^5	44
UT-7/EPO	C	10	1IU/ml EPO	1∶5	1×10^5	44
WEHI-164	A	5		1∶10	2×10^5	72
wwf7	A	5	100ng/ml IL-7 和 fit3 配体	1∶4	4×10^5	24
32D/Mpl+	D	10	1ng/ml 小鼠 IL-3	1∶5	1×10^5	44

1. 细胞培养液：A：RPMI-1640 完全培养液；A+：RPMI-1640 完全培养液加 50mol/L 2-巯基乙醇；B：McCoy 培养液加 50mol/L 2-巯基乙醇、1mmol/L 丙酮酸钠、0.5% 非必需氨基酸、1% 必需氨基酸、0.12% 碳酸氢钠、20mg/ml 天冬酰胺、8mg/ml 丝氨酸，0.5% 维生素；C：IMEM 培养液；D：MEM 培养液。2. FCS：胎牛血清。3. 分瓶指传代时每瓶分为若干瓶继续培养，如 1∶5 指 1 瓶分为 5 瓶。4. 检测细胞因子活性时用含 FCS 培养液将细胞稀释到该浓度，在 96 孔细胞培养板每孔加 0.1ml。

用中和抗体区分细胞因子的中和实验方法是：将样品系列稀释为两个系列，一个系列加适量中和抗体以中和细胞因子的活性；另一个系列不加抗体，两个系列所得结果的差异即为该细胞因子的活性。如果同时应用多个中和抗体做中和实验，可以在一次实验中定量检测样品中的多个细胞因子。

检测促进或抑制细胞生长活性的过程包括：将对数生长期靶细胞与梯度稀释的细胞因子共同培养一定时间，然后检测生长的靶细胞数，与对照相比求得促进或抑制细胞生长的百分率。细胞生长数量的变化与细胞因子浓度成正比例关系。因此，准确计数活细胞数是关键。检测靶细胞数的方法要求较为敏感。因为靶细胞经过抑制生长后，只有用敏感的方法才能计数并计算百分比。检测活靶细胞数的方法主要有酶检测法、^{3}[H] 脱

氧胸苷（^{3}HTdR）摄入法和染料染色法。酶检测法反映细胞的能量代谢，^{3}HTdR 摄入法反映细胞的 DNA 合成，由于 DNA 合成与细胞的能量代谢密切相关，所以两种方法的结果一致，可以用酶检测法代替^{3}HTdR 摄入法。酶检测法稳定、客观、不需接触放射性核素，应为首选。由于酶检测法和^{3}HTdR 摄入法分别反映细胞的不同状态，在计数一些未分裂增殖但仍存活的细胞时，只能用酶检测法，用^{3}HTdR 摄入法则得不到结果。

另外，检测促进细胞生长活性时，接种的靶细胞应当少一点，以留下足够的生长空间；检测抑制细胞生长活性时，接种的靶细胞应当多一点，以保证培养结束时有足够的细胞供检测。

靶细胞株在体外长期培养后会发生突变，对细胞因子的敏感性降低或消失。所以要早期冻存细胞，定期复苏用以代替突变的细胞，必要时可重新筛选。

（一）MTT 检测法检测 IL-2 促增殖活性

活细胞，特别是增殖的细胞中能量代谢旺盛，其中线粒体能量代谢过程中产生的琥珀酸脱氢酶可将淡黄色的四甲基偶氮唑盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT]还原成蓝紫色的结晶（formazan）沉积在细胞内和细胞周围，形成的结晶与增殖的细胞数成正比。用二甲基亚砜（DMSO）溶解结晶即可在酶标比色计上直接比色。

MTT 检测法是应用最广泛的检测细胞数的方法，虽然简便准确，但其还原产物为结晶体，需要用 DMSO 溶解；还有假阳性的问题。培养液中的血清、人血白蛋白、酚红、免疫球蛋白或其他添加物都可能产生假阳性。所以，在试验中应考虑同时做无细胞的培养液对照，以排除假阳性问题。目前，有用 MTS、WST-8 检测法（Cell Counting Kit-8 中的主要试剂）等能产生水溶性还原产物的方法取代 MTT 检测法（见下述），但试剂价格较高。

材料与试剂

1%台盼蓝（trypan blue）
二甲基亚砜（DMSO）
IL-2 标准品：见表 9-1，可根据国际参考标准品标定各实验室自己的参考标准品
无血清 RPMI-1640 完全培养液
含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（10-1640 培养液）
MTT 染液（5mg/ml 溶于 PBS 中）
96 孔细胞培养板
37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱
培养板振荡器
酶联检测仪

步骤

1）用无血清 RPMI-1640 完全培养液洗涤对数生长期（培养 2～3d）的 CTLL-2 细

胞 2 次，每次 250g 离心 10min，洗去培养液中残存的 IL-2。

2）用台盼蓝拒染法计数细胞并决定细胞的活力（活细胞应>95%），用 10-1640 培养液悬浮细胞至 1×10^5 个/ml。

3）取 96 孔细胞培养板，每孔中加 0.1ml 含 1×10^4 CTLL-2 细胞的 10-1640 培养液。

4）用 10-1640 培养液 2 倍递次稀释 IL-2 标准品（从 40IU/ml 稀释到 0.019IU/ml，共 8～10 个稀释度），根据情况 2～5 倍递次稀释待检样品。每孔加 0.1ml 稀释的标准品或待检样品，每个稀释度设 3 个重复孔。对照孔 6 个：3 个阳性对照孔，每孔加 0.1ml 含 200IU/ml IL-2 的 10-1640 培养液；3 个阴性对照孔，每孔加 0.1ml 10-1640 培养液。在 CO_2 培养箱中培养 40h。

5）每孔加 10μl MTT 染液，在 CO_2 培养箱中培养 4～6h。

6）1500r/min 离心培养板 5min，小心吸去大部分培养液。

7）每孔加 0.1ml DMSO，室温避光放置 30min，在培养板振荡器上振荡混匀 10s，让还原产物（紫色结晶）充分溶解。

8）置酶联检测仪上测定光密度（OD）值，检测波长 570nm，参考波长 630nm。以 OD 值对样品稀释度作图，绘制标准品曲线和待测样品曲线。比较两曲线 50% 最大 OD 值处的样品稀释度即可求得待测样品中细胞因子的含量。

注意事项

1）CTLL-2 细胞的存活率应大于 95%。

2）待测样本中可能含 IL-4 等其他能促进 CTLL-2 细胞增殖的细胞因子，影响 IL-2 的测定；最好在步骤 2）时增加一组系列稀释的待测样本＋适量抗 IL-2 中和抗体。该组中 CTLL-2 细胞的增殖代表非 IL-2 诱导的增殖。

3）使用 96 孔板进行检测，如果细胞培养时间较长，要注意蒸发的问题。由于 96 孔板周围一圈最容易蒸发，可以弃用周围一圈，改加 PBS、水或培养液；也可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。

4）由于检测依赖于脱氢酶催化的反应，如果待检测体系中存在抗氧化剂会干扰检测。培养液中的酚红、血清等会干扰比色结果，所以在加入 MTT 前最好将培养液洗去。

5）加入 DMSO 后，应在 1h 内比色。

6）通常 MTT 检测法检测 5×10^2～5×10^4 个细胞时细胞数与 OD 值呈直线关系。

7）配制 MTT 时常需适当加热，滤过除菌后分装，4℃避光保存。

8）标准的实验过程应分别系列稀释标准品和待测样品，并绘制标准曲线与待测样品的曲线。两条曲线应当呈平行的 S 形，说明是同样的分子反应。比较标准品曲线和待测样品曲线时，在最大 OD 值的 50%处做一水平线，比较两条曲线与水平线交叉点的稀释度，即可从标准品的 IL-2 浓度得到待测样品中 IL-2 的浓度。

有时可仅系列稀释标准品和绘制标准曲线，待测样品只有 1 个稀释度，在标准曲线上找出待测样品的相应位置，从而判断样品中细胞因子的浓度。按公式计算：样品原始

浓度＝标准品原始浓度×（样品稀释度×样品 OD 值）/（标准品稀释度×标准品 OD 值）。该法准确性较差，当该样品稀释度的 OD 值正好落在标准曲线的线性区时，结果较为可靠；但远离线性区时，结果不可靠。

图 9-2 是 1 次实验的结果。标准品原始浓度是 2000U/ml，标准品曲线 50％最大 OD 值对应的倍比稀释度是 $7.19=\log_2 146.0$，即 146.0 倍稀释；样品 1 曲线 50％最大 OD 值对应的倍比稀释度是 6.10，即 68.6 倍稀释；样品 2 曲线 50％最大 OD 值对应的倍比稀释度是 8.02，即 259.6 倍稀释。因此，样品 1 的原始浓度是 2000×68.6/146.0＝939.7U/ml，样品 2 的原始浓度是 2000×259.6/146.0＝3556.2U/ml。

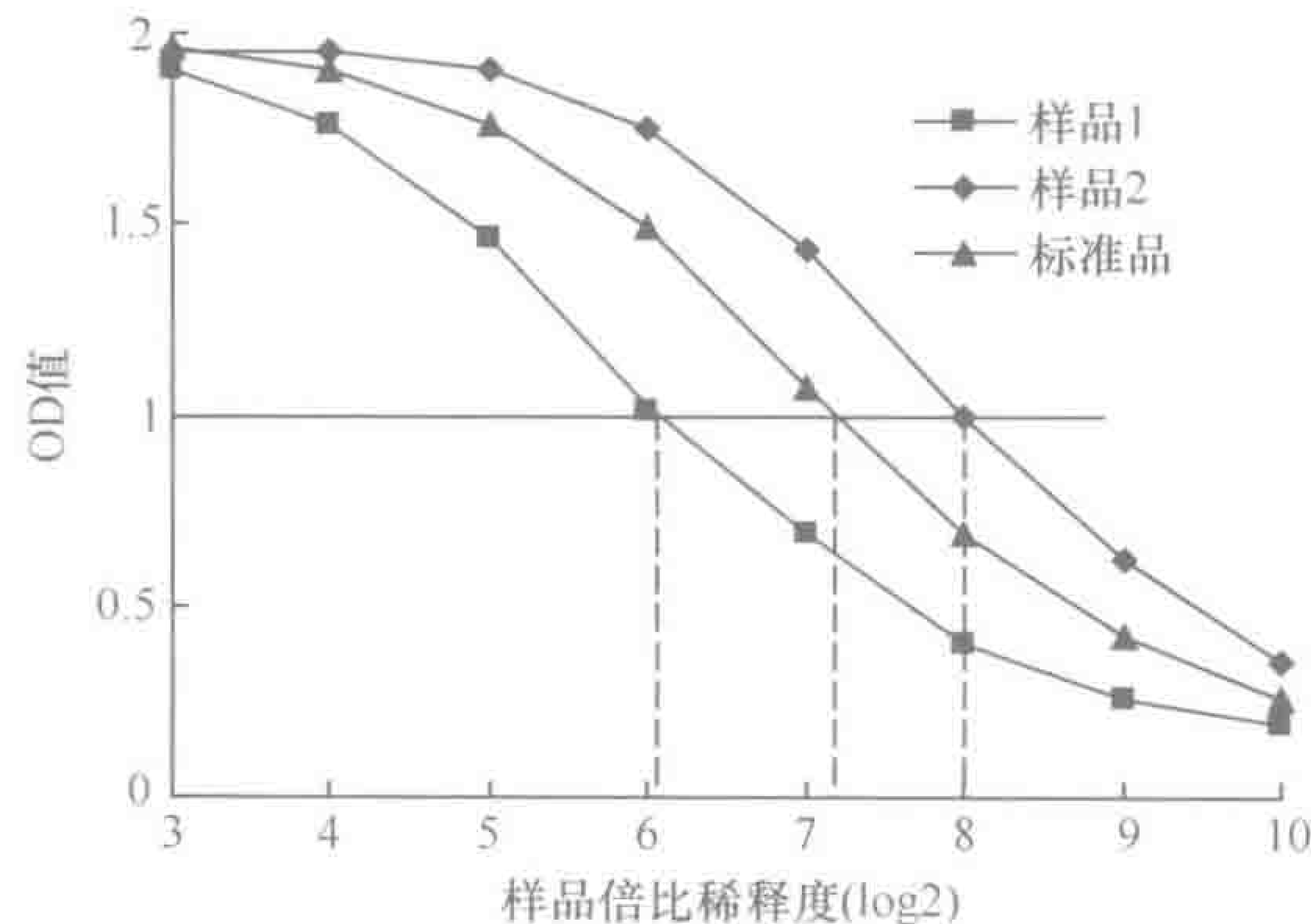


图 9-2　MTT 法检测 IL-2 的实验结果

（二）MTS/PMS 检测法检测 IL-3 促增殖活性

四氮唑 MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium,inner salt]在有电子偶联剂吩嗪硫酸甲酯（phenazine methosulfate，PMS）存在时可被活细胞中的酶还原成水溶性代谢产物。MTS/PMS 法更简便、结果更准确敏感，优点是：①稳定，用缓冲液可以配成 5mg/ml（pH≥6.5），在 4℃暗处保存几周，不必临时配制；②溶液容易配制，不必加热；③显色反应出现得快，一般加入 MTS 后 1h 即可测定，最佳显色时间是 2～4h；④还原产物呈水溶性，可直接测定光吸收值；且检测波长范围广（OD_{490}～OD_{570}），用 OD_{490}、OD_{570} 或 OD_{570}/OD_{690} 的比值 3 种方法检测 MTS 产物的结果基本相同；⑤MTS 的显色反应与细胞数成正比例并随反应时间的延长而颜色加深，不受酚红或血清等影响；⑥MTS/PMS 的还原反应还可以与 ^{3}HTdR 掺入同时进行，相互影响很小，可以同时了解细胞增殖（DNA 合成）和细胞活力（酶代谢）。

材料与试剂

IL-3 标准品

台盼蓝（1％）

无血清 DMEM 培养液

含 10％小牛血清的 DMEM 培养液（10-DMEM 培养液）

MTS/PMS 染液

96 孔细胞培养板

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

培养板振荡器

酶联检测仪

步骤

1）用无血清 DMEM 培养液洗涤对数生长期（培养 2～3d）的 FDC-P1 细胞或 FL5.12 细胞 2 次，每次 250g 离心 10min，洗去培养液中残存的 IL-3。

2）用台盼蓝（1%）拒染法计数细胞并决定细胞的活力（活细胞应>95%），用 10-DMEM 培养液悬浮细胞至 1×10^5 个/ml。

3）取 96 孔细胞培养板，每孔中加 0.1ml 含 1×10^4 FDC-P1 细胞或 FL5.12 细胞的 10-DMEM 培养液。

4）用 10-DMEM 培养液 2 倍递次稀释 IL-3 标准品，根据情况 2～5 倍递次稀释待检样品，每孔加 0.1ml 稀释的标准品或待检样品，每个稀释度设 3 个重复孔。对照孔 6 个：3 个阳性对照孔，每孔加 0.1ml 含 100ng/ml IL-3 的 10-DMEM 培养液；3 个阴性对照孔，每孔加 0.1ml 10-DMEM 培养液。在 CO_2 培养箱中培养 24h。

5）每孔加 20μl MTS/PMS 染液，在 CO_2 培养箱中培养 2～4h。

6）在培养板振荡器上振荡 10s，让还原产物充分混匀。

7）置酶联检测仪上测定 OD 值，检测波长 570nm。以 OD 值对样品稀释度作图，比较标准品曲线和待测样品曲线即可求得待测样品中细胞因子的含量。

注意事项

1）FDC-P1 细胞或 FL5.12 细胞的存活率应大于 95%。

2）待测样本中可能含其他能促进 FDC-P1 细胞或 FL5.12 细胞增殖的细胞因子，影响 IL-3 的测定；最好在步骤 2）时增加一组系列稀释的待测样本+适量抗 IL-3 中和抗体。该组中细胞的增殖代表非 IL-3 诱导的增殖。

3）使用 96 孔板进行检测时，如果细胞培养时间较长，要注意培养液蒸发的问题。由于 96 孔板周边一圈各孔中培养液最容易蒸发，可以弃用周围一圈各孔，改加 PBS、水或培养液；也可以把 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。

4）本检测方法依赖于脱氢酶催化的反应，如果待测样品中存在抗氧化剂会干扰检测。

5）用PBS 分别配制 6.4mmol/L MTS 和 1.44mmol/L PMS 的保存液，4℃暗处可保存 1～2 周。用时按 1∶100 和 1∶1000 的比例分别加入培养物中。也可合并用 PBS 配制成含 6mmol/L MTS 和 0.33mmol/L PMS 的混合保存液，用时按 1∶100的比例加入培养物中。MTS/PMS 混合保存液呈金黄色，pH5.2～5.4，滤过除菌后 4℃暗处可保存数周。

6）如果同时检测细胞掺入^{3}HTdR的量，在加入MTS/PMS的同时每孔加入0.5～1μCi ^{3}HTdR，继续培养4～6h。在用酶标检测仪检测OD值以后，将细胞收集到玻璃纤维滤纸上，在液闪仪上计数掺入细胞的同位素的量。绘制剂量-反应曲线，根据标准品曲线可同时计算细胞代谢情况和细胞中DNA合成的情况。

7）标准的实验过程应分别系列稀释标准品和待测样品，并绘制标准曲线与待测样品的曲线。两曲线应当呈平行的S形，说明是同样的分子反应。比较标准品曲线和待测样品曲线时，在最大OD值的50%处做一水平线，比较两条曲线与水平线交叉点的稀释度，即可从标准品的IL-3浓度得到待测样品中IL-3的浓度。

8）有时可仅系列稀释标准品和绘制标准曲线，待测样品只有1个稀释度，在标准曲线上找出待测样品的相应位置，从而判断样品中细胞因子的浓度。该法准确性较差，当该样品稀释度的OD值正好落在标准曲线的线性区时，结果较为可靠；但远离线性区时，结果不可靠。

（三）WST-8检测法检测细胞因子

细胞计数试剂盒（Cell Counting Kit-8，CCK-8试剂盒），是以WST-8为主要试剂的用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度的检测试剂盒。

WST-8类似于MTT，在电子耦合试剂存在的情况下，可以被活细胞线粒体内的脱氢酶还原生成橙黄色的结晶。颜色深浅与细胞数呈线性关系。WST-8的优点是：试剂更稳定，其还原产物为水溶性，比MTT和MTS灵敏度更高。基于WST-8开发的CCK-8试剂盒，无须配制，不必洗涤待测细胞，直接加入培养孔即可，显色后可以在较长时间内检测（但应多次测板，找到最佳测定时间），酚红和血清对测定无明显影响。

CCK-8试剂盒的应用请参考说明书。通常在细胞因子刺激细胞结束前，每0.1ml培养物中直接加10μl CCK-8，继续培养1h（根据细胞类型和密度，培养时间可为0.5～4h），用酶联检测仪检测450nm的吸光度。可以在不同时间间隔检测板孔，选取适宜的时间点用于实验。

（四）^{3}HTdR掺入法测定人IL-4促增殖活性

^{3}HTdR可进入细胞，被合成为^{3}HdTTP，在DNA合成时使^{3}H掺入已合成的DNA中。因此^{3}HTdR掺入法可敏感、精确地检测分裂增殖的细胞数量，常用于检测各种细胞因子的促生长活性和抑制细胞生长活性。这里以CT.h4S细胞检测人IL-4为例，介绍具体的方法。CT.h4S是将人IL-4受体基因转入小鼠CT.4S所得到的细胞株，对IL-2的敏感性较低。CT.4S则是CTLL-2的衍生细胞，对小鼠IL-4高度敏感，对IL-2敏感性低，对其他细胞因子不应答。因此用CT.4S细胞的增殖实验，可从含较高浓度IL-2（100U/ml）或其他细胞因子的IL-4待测样本中定量检测出小鼠IL-4，方法与下列方法类似。

材料与试剂

0.25%胰蛋白酶

台盼蓝（1%）

人 IL-4 标准品：见表 9-1，可根据国际参考标准品标定各实验室自己的参考标准品

无血清 RPMI-1640 完全培养液

含 10%小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（10-1640 培养液）

^{3}HTdR 溶液（6.7Ci/mmol，GE 公司）

闪烁液

3%乙酸水溶液

96 孔细胞培养板

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

多头细胞收集器

玻璃纤维滤纸

液闪仪

步骤

1）取对数生长期（培养 2～3d）的 CT.h4S 细胞，用 0.25%胰蛋白酶消化 5min，或用细胞刮将细胞从培养瓶中刮下。

2）收集细胞。用无血清 RPMI-1640 完全培养液洗涤细胞两次，每次 220g 离心 10min，洗去培养液中残存的 IL-4。置冰上。

3）用台盼蓝拒染法计数细胞并决定细胞的活力（活细胞应>95%），用 10-1640 培养液悬浮细胞至 1×10^5 个/ml。

4）取 96 孔细胞培养板，每孔中加 0.1ml 含 1×10^4CT.h4S 细胞的 10-1640 培养液。

5）用 10-1640 培养液 2 倍递次稀释 IL-4 标准品，根据情况 2～5 倍递次稀释待检样品，每孔加 0.1ml 稀释的标准品或待检样品，每个稀释度 3 个重复孔。对照孔 6 个：3 个阳性对照孔，每孔加 0.1ml 含 100ng/ml IL-4 的 10-1640 培养液；3 个阴性对照孔，每孔加 0.1ml 10-1640 培养液。在 CO_2 培养箱中培养 48h。

6）每孔加 20μl 含 1.85×10^4Bq（0.5μCi）^{3}HTdR 的培养液，在 CO_2 培养箱中培养 18h。

7）用多头细胞收集器将细胞收集到玻璃纤维滤纸上，用 3%乙酸水溶液洗涤滤纸 3 次，洗去游离的^{3}HTdR。将滤纸置液体闪烁瓶中，加入 5ml 闪烁液。在液闪仪上计数细胞掺入的放射性核素活性（每分钟放射性计数，cpm），根据仪器效率换算成 dpm（每分钟衰变数）。

8）用 dpm 值对样品稀释倍数作图。在图上，标准 IL-4 的曲线与待测样品的曲线应当呈平行的 S 形，说明是同样的分子反应。比较同样 dpm 值处（通常在 50%最大 dpm 处做一水平线）的不同稀释倍数，决定待测样品的相应浓度。

注意事项

1）离心洗涤细胞时离心力不要超过 265g。如果 IL-4 存在，细胞中冰上放置不超过 30min。

2）闪烁液可直接购买，亦可配制：5g 2,5 二苯基 唑（2,5-diphenyloxazole, PPO），0.3g 1,4-双（5-苯基-2- 唑）苯［1,4-bis(5-phenyl-2-oxazolyl)-ben-

zene,POPOP]，200ml 无水乙醇和 800ml 甲苯。

3）标准的实验过程应分别系列稀释标准品和待测样品，并绘制标准曲线与待测样品的曲线。两曲线应当呈平行的 S 形，说明是同样的分子反应。比较标准品曲线和待测样品曲线时，在最大 OD 值的 50%处做一水平线，比较两条曲线与水平线交叉点的稀释度，即可从标准品的 IL-4 浓度得到待测样品中 IL-4 的浓度。

4）有时可仅系列稀释标准品和绘制标准曲线，待测样品只有 1 个稀释度，在标准曲线上找出待测样品的相应位置，从而判断样品中细胞因子的浓度。该法准确性较差，当该样品稀释度的 OD 值正好落在标准曲线的线性区时，结果较为可靠；但远离线性区时，结果不可靠。

二、一些 IL 的特殊生物学活性的检测

除了用依赖细胞株检测细胞因子的促进或抑制细胞增殖的活性以外，还可用其他方法检测细胞因子的其他生物学活性。例如，IL-5 能诱导骨髓中嗜酸粒细胞分化、增殖，可用嗜酸粒细胞分化实验检测。

一些细胞因子能诱导 B 细胞产生免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig)，如 IL-4 能诱导 IgE 产生、IL-5 能诱导 IgA 产生、IL-6 能诱导 IgM 产生等。利用这一特点，可用细胞因子和抗原（常用灭活的金黄色葡萄球菌 Cowan1 株）协同刺激小鼠或人的 B 细胞（分离方法参见第五章）4～5d，再检测培养上清中的 Ig 含量，诱导产生的 Ig 量与待测样本中相应细胞因子的量成正比。

一些细胞因子能诱导细胞产生其他细胞因子。例如，人 IL-10 在有小鼠 IL-4 存在的条件下能诱导 D36 肥大细胞产生 IFN-γ，IL-12 能诱导 $CD4^+$ T 细胞分化为 Th1 细胞产生 IFN-γ，IL-18 也能诱导 PBMC 产生 IFN-γ。因此，用不同的细胞，在不同的条件下，可检测这些细胞因子诱导 IFN-γ 的能力，再检测培养上清中的 IFN-γ 含量，根据产生的 IFN-γ 量推断待测样本中相应细胞因子的量。

（一）检测 IL-5 的嗜酸粒细胞分化实验

IL-5 能诱导骨髓中嗜酸粒细胞分化成熟，取小鼠或人的骨髓细胞，加含 IL-5 的待测样本共培养后，检测嗜酸粒细胞过氧化物酶（eosinophil peroxidase）活性间接判定增殖的嗜酸粒细胞数，并根据酶活性推断待测样本中 IL-5 的量。实验需用较多嗜酸粒细胞，一般使用经中孔绦虫（*Mesocestoides corti*）感染 9～24d 的小鼠骨髓嗜酸粒细胞，或 IL-5 转基因小鼠的骨髓嗜酸粒细胞。

材料与试剂

细胞培养液：含 10mmol/L Hepes，24mmol/L $NaHCO_3$，2mmol/L 谷氨酰胺，1mmol/L 丙酮酸钠，75μmol/L 硫代甘油（monothioglycerol)，1μmol/L 氢化可的松，15%胎牛血清和抗生素的 RPMI-1640 完全培养液

洗涤液：含 20mmol/L Hepes、5%胎牛血清和抗生素的 RPMI-1640 完全培养液

底物液：新鲜配制，充分混合下列溶液：97ml 50mmol/L pH8.0 Tris-HCl，2ml

10mg/ml 二盐酸苯二胺（*O*-phenylenediamine dihydrochloride，OPD，水溶液，1～2ml 分装，－70℃保存），1ml 10% Triton X-100（4℃保存）和 12μl 30%（体积比）过氧化氢。

步骤

1a）小鼠骨髓细胞的制备（参见第二章），注意无菌操作。

2a）用细胞培养液将细胞配成 1×10^6 个/ml。通常每根股骨可得到约 10^7 个细胞。

1b）人骨髓细胞的制备：外科方式无菌抽取骨髓，用洗涤液将细胞配成 1×10^7～2×10^7 个/ml。按第一章分离 PBMC 的方法用淋巴细胞分离液分离骨髓细胞。

2b）用洗涤液洗涤细胞 2 次，每次 500*g* 离心 10min。用细胞培养液将细胞配成 1×10^6 个/ml。

3）取 96 孔圆底细胞培养板，每孔加上述分离的人或小鼠骨髓细胞 0.1ml。

4）倍比稀释 IL-5 的标准品和待检样品，每个样品至少 8 个稀释度，每个稀释度 3 个复孔，每孔加 0.1ml 稀释样品液。阴性对照孔加 0.1ml 细胞培养液。

5a）在 CO_2 培养箱中培养小鼠骨髓细胞 5d。

5b）在 CO_2 培养箱中培养人骨髓细胞 18～21d，于第 10 天更换新鲜培养液并加同样稀释度的冻存样品（取出冻存样品，37℃融化后用）。

6）嗜酸性粒细胞过氧化物酶试验。

小心吸去各孔的培养液，不要吸去细胞，必要时先 500*g* 离心 10min。

每孔加 0.1ml 底物液。室温中放置 30min。

每孔加 50μl 4mol/L 硫酸终止反应。

在酶标计数仪上计数 490～492nm 处的光吸收值。

IL-5 的单位以 50%最大生物活性所对应的稀释度的倒数表示。或根据标准品的剂量-反应曲线确定。

注意事项

由于人的骨髓细胞过氧化物酶试验需要培养较长时间（18～21d），在第 10 天左右要更换新鲜培养液和同样稀释度的样品，所以各个稀释度的样品均须留下备份，保存在－20℃或－80℃，用前在 37℃迅速融化，立即加入培养物中。

（二）用 D36 细胞检测 IL-10 活性

D36 细胞是从 DBA/2 小鼠骨髓中诱导的肥大细胞传代株，可检测 0.05～10U/ml 的人 IL-10 或小鼠 IL-10。由于血清中含有抑制 D36 细胞生长的物质，所以本法不能用于检测血清样品。

D36 细胞也可从 DBA/2 小鼠骨髓细胞中筛选获得：取 DBA/2 小鼠骨髓细胞，用含 10%胎牛血清、5×10^{-5} mol/L 2-巯基乙醇、10U/ml 重组小鼠 IL-3、8U/ml 重组小鼠 IL-4 的 IMDM 培养液将骨髓细胞稀释到 2×10^4～6×10^4 个/ml。96 孔细胞培养板每孔中加 50μl 细胞悬液，CO_2 培养箱中培养 2～3 周，每 5～7d 换液一次。待细胞能稳定生长并且数量足够检测时，筛选对 IL-10 反应最强的细胞株，扩增、冻存。

检测 IL-10 的方法可用 MTT 检测法和^{3}HTdR 掺入法（本章第二节“一、白细胞介素及其他细胞因子调节细胞生长的检测”）。但所用培养液为含 20%胎牛血清、8U/ml重组小鼠 IL-4 的 IMDM 培养液，接种密度是每孔2×10^3 个细胞，培养时间为 24h。

三、IL 蛋白质的检测

检测和研究各种 IL 及其受体蛋白的存在和含量的方法很多，最常用的是酶联免疫吸附试验（ELISA）。用 ELISA 检测蛋白质的详细操作步骤参见第十四章，用该法检测各种 IL 时略有不同的是：用抗某种 IL 特异性抗体（如抗 IL-2 单抗）包被检测板，加入待测样本后，用另一种抗该种 IL 特异性抗体（如兔抗 IL-2 多抗）结合被包被抗体固定在板上的该种 IL，最后加酶标二抗（如羊抗兔 Ig）和底物显色。

在第十四章还介绍了检测分泌细胞因子的细胞的 ELISPOT 实验。其原理是用一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子某一表位的小鼠来源的单克隆抗体）包被 96 孔板。加入经不同处理的细胞培养，让细胞产生细胞因子。产生的细胞因子立即被包被的抗体吸附在板上。洗去细胞后用另一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子另一表位的兔抗细胞因子多克隆抗体）结合已吸附在板上的细胞因子。最后加入酶标记的羊抗兔 IgG 抗体和底物显色。用可溶性底物显色，可根据颜色的深浅了解产生细胞因子的细胞数量；如果用不溶性底物显色，则可根据形成的斑点，直接计数产生细胞因子的细胞。

另外，用放射免疫技术或发光免疫技术检测各种液相中的细胞因子或可溶性受体的含量（参见第十三章至第十五章），用流式细胞仪检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十五章），用 Western 印迹方法检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十二章），用免疫组化方法定位研究细胞因子或其受体在组织中的分布（参见第二十七章）。

四、IL mRNA 的检测

RT-PCR 和定量 RT-PCR 技术检测各种细胞表达 IL 或其受体 mRNA 的详细操作步骤（参见第十七章）。

第三节　肿瘤坏死因子

肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）是能够引起肿瘤组织出血坏死，并具有多方面功能的细胞因子。TNF-α 是一种重要的促炎细胞因子，参与多种免疫性炎症的发生和发展过程，是自身免疫病、全身性炎症反应综合征等主要介质。TNF-α 对新生血管的抑制作用是其引起肿瘤组织出血坏死的主要原因。TNF-α 生物学活性非常复杂，包括对造血、免疫和炎症的调节；对血管和凝血的影响和对多种器官（肝、心脏、骨、软骨、肌肉和其他组织）的作用等。因此检测和研究 TNF 对了解多种疾病发生、发展和转归有重要意义。

与 TNF 结构相似的细胞因子构成 TNF 超家族，它们主要以膜结构的方式存在，

介导细胞之间的相互作用，调控细胞的分化发育、活化和凋亡，包括 TNF-α、TNF-β、LT-β、CD30L、CD40L、LIGHT、TRANCE、TRAIL、FasL、4-1BBL、OX40L、CD70 等。

TNF 的受体有两种：TNFR1（TNFRp55）和 TNFR2（TNFR p75）。TNFR1 可介导 TNF 诱导细胞凋亡的活性，而 TNFR2 与 TNF 促进细胞增殖和引起炎症反应的活性有关。与 TNF 结构和功能相似的膜受体组成 TNFR 超家族，包括 TNFR1、TNFR2、CD30、CD40、HVEM、TR6/DcR3、RANK、TRAILR1、Fas、4-1BB、OX40、CD27 等。

检测和研究 TNF 生物学活性的方法主要有体外实验和体内实验。体外实验以检测 TNF 的细胞毒活性最常用。体内实验则是直接检测 TNF 引起肿瘤组织出血坏死的能力。

一、检测 TNF 及细胞因子细胞毒活性的方法

许多细胞因子（如 TNF、LT、IFN 和 TGF-β 等）都有溶细胞（cytolytic）或抑制细胞生长（cytostatic）的活性。这种活性主要针对病毒感染的细胞、转化的细胞和有代谢损伤的细胞。细胞因子在体外的溶细胞/抑制细胞生长活性与实验中细胞因子的浓度、作用时间、靶细胞种类和密度，以及环境中是否存在影响因素等有关。因此应选择适当的靶细胞（常用 L929、WEHI-164 和 L-M 等），并且控制实验条件。检测溶细胞或细胞毒活性时，最好选择贴壁细胞，以便在细胞因子作用后洗去死细胞，染色活细胞；接种的靶细胞应适当多些，使检测时有足够的活细胞；作用时间以阳性对照孔细胞全部死亡时为宜。如果检测抑制细胞生长的活性，靶细胞不要太多，作用时间以阴性对照孔细胞接近长满时为宜。

靶细胞株在体外长期培养后会发生突变，对细胞因子的敏感性降低或消失。所以要早期冻存细胞，定期复苏用以代替突变的细胞。必要时可重新筛选。

检测溶/抑制细胞生长活性的实验过程：将梯度稀释的细胞因子与对数生长期靶细胞共同培养一定时间，然后检测存活的靶细胞数，与对照或标准品相比求得溶细胞/抑制细胞生长的百分率。所以实验关键是准确计数活细胞，可选用本章第二节介绍的 MTT 法、MTS 法、WST-8 法或 ^{3}HTdR 掺入法。

检测细胞毒活性的结果，通常用能诱导 50%最大细胞死亡的待测样品最高稀释度（endpoint，EP）作为参考效价（或滴度），而将此稀释度中所含的细胞因子量定义为 1 个单位（unit，U），此稀释度的倒数除以反应总体积的毫升数即为每毫升样品中细胞因子的单位数（U/ml）。阴性对照孔的 OD 值定为 100%细胞存活，而阳性对照孔的细胞通常全部死亡。样品中细胞因子的细胞毒活性应当与细胞因子标准品的细胞毒活性比较并加以调整。以 2 倍稀释的 TNF 样品和标准品的细胞毒活性为例：待测样品中 TNF 活性（U/ml）＝标准品中 TNF 活性（U/ml）$\times 2^{(\text{待测样品EP}-\text{标准品EP})}$。

较为准确的结果判定是以 OD 值对样品稀释度作图，绘制标准品的剂量-反应标准曲线，在曲线上求得引起相应反应的待测样品的含量。最好是同时绘制标准品和待测样品的剂量-反应曲线，两种曲线应当平行，说明是同样分子诱导的反应。再根据 50%最大反应的相对值，从标准品的浓度求得待测样品中细胞因子的浓度。

（一）用 L929 细胞检测 TNF 的细胞毒活性

检测 TNF 生物活性最常用的方法是检测 TNF 对 WEHI-164 细胞或小鼠成纤维细胞（L929 或 L-M）的细胞毒性，其中 L929 及其衍生细胞株 L-M 对 TNF 较敏感。用特异性中和抗体可区分 TNF-α 和 TNF-β：中和试验要同样倍比稀释两个系列的 TNF 样品，其中一个系列中加入等量相应的中和抗体，在室温下作用 2h 后，分别与靶细胞作用，加和未加中和抗体样品的结果相对照即可区分两者。

材料与试剂

消化液（2%的胰蛋白酶，PBS 配制）

含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（10-1640 培养液）

含 1μg/ml 放线菌素 D（actinomycin D）的 10-1640 培养液（AcD-1640 培养液）

MTT 染液（5mg/ml 溶于 PBS 中，滤过除菌，4℃避光保存）

二甲基亚砜（DMSO）

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

微量板振荡器

酶联检测仪

96 孔细胞培养板

步骤

1）取对数生长期 L929 细胞（培养 1～2d），吸去培养液，加 5ml 消化液，37℃消化 5min。2000r/min 离心 5min，洗去消化液，用 10-1640 培养液将细胞配成 2×10^5 个/ml。

2）取 96 孔细胞培养板，每孔中加 0.1ml L929 细胞悬液，在 CO_2 培养箱中培养 2～3h，让细胞贴壁。

3）用 AcD-1640 培养液倍比稀释 TNF 标准品（100U/ml→0.78U/ml，共 8 个稀释度），根据情况 2～5 倍系列稀释待测样品，每孔加 0.1ml 稀释物，每个稀释度 3 个重复孔。对照孔 6 个：3 个阳性对照孔，每孔加 0.1ml 含 1000U/ml TNF 的 AcD-1640 培养液；3 个阴性对照孔，每孔加 0.1ml AcD-1640 培养液。在 CO_2 培养箱中培养 24～48h。

4）吸去培养液，用 PBS 洗涤一次。

5）每孔加 0.1ml PBS 和 10μl MTT 染液，在 CO_2 培养箱中培养 4～6h。

6）吸去染液，每孔加 0.1ml DMSO，在微量板振荡器上振荡混匀，让还原产物充分溶解。

7）置酶联检测仪上测定光密度（OD）值，检测波长 570nm，参考波长 630nm。以 OD 值对样品稀释度作图，比较标准品曲线和待测样品曲线即可求得待测样品中细胞因子的含量。

注意事项

1）放线菌素 D 可大大提高 L929 对 TNF 的敏感性。在放线菌素 D 的浓度小于

1μg/ml 时，TNF 效价随放线菌素 D 浓度的增高而增高，大于 1μg/ml 后 TNF 效价出现平台，放线菌素 D 过高则有非特异的细胞毒性，所以通常用 12μg/ml。

2）步骤 3）的培养时间以阳性对照孔细胞死亡 90%～100%为准，用倒置显微镜观察确定。

3）步骤 5）时用 PBS 培养细胞是防止细胞继续生长。加入 DMSO 后，应在 1h 内比色。

4）通常 MTT 检测法检测 5×10^2～5×10^4 个细胞时细胞数与 OD 值呈直线关系，根据靶细胞的种类直线关系略有不同，应事先确定。

5）亦可在步骤 5）以后，用 MTS 染色法、^{3}HTdR 掺入法、结晶紫染色法测定活细胞数（详见本章第二节、第四节）。

（二）用 WEHI-164 细胞检测 TNF 的细胞毒活性

WEHI-164 细胞也是对 TNF 敏感的细胞株。虽然其敏感性稍低于 L929 细胞，但实验中不必加放线菌素 D，所以也常用于检测 TNF 的细胞毒活性。

材料与试剂

消化液（含 0.05% 胰蛋白酶和 0.01% EDTA 的 PBS，pH7.2）

含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（10-1640 培养液）

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

96 孔细胞培养板

步骤

1）取对数生长期 WEHI-164 细胞（培养 1～2d），吸去培养液，加 5ml 消化液，37℃消化 5min。2000r/min 离心 5min，洗去消化液，用 10-1640 培养液将细胞配成 2×10^5 个/ml。

2）取 96 孔细胞培养板，每孔中加 0.1ml WEHI-164 细胞悬液，在 CO_2 培养箱中培养 2～3h，让细胞贴壁。

3）用 10-1640 培养液倍比稀释 TNF 标准品（100U/ml→0.78U/ml，共 8 个稀释度），根据情况 2～5 倍系列稀释待测样品，每孔加 0.1ml 稀释物，每个稀释度 3 个重复孔。对照孔 6 个：3 个阳性对照孔，每孔加 0.1ml 含 4μg/ml TNF 的 10-1640 培养液；3 个阴性对照孔，每孔加 0.1ml 10-1640 培养液。在 CO_2 培养箱中培养 24～48h。

4）吸去培养液，用 PBS 洗涤一次。

5）在细胞毒反应结束以后，可用 MTT 检测法、MTS 染色法、结晶紫染色法测定活细胞数（详见本章第二节、第四节）。

（三）TNF 生物活性的体内检测法

体内检测法是一种定性或半定量的方法，通常用于研究 TNF 的抗肿瘤作用。尽管

实验周期长、成本高，而且受动物的个体差异、接种部位和肿瘤生长状态的诸多影响，但此法能直接反映样品中的 TNF 对肿瘤的作用。

体内检测法通常用小鼠的成纤维肉瘤细胞株（Meth A）为靶肿瘤，以肿瘤局部的出血坏死为指标，观察容易，现象客观。

Meth A 肉瘤需在小鼠腹腔中传代：取 20g 左右健康 BALB/c 小鼠或 BALB/c×C57BL/6 的 F_1 代小鼠，腹腔注射 5×10^5 Meth A 肉瘤细胞。7～10d，待腹水长成后，选择无感染或自发出血坏死的荷瘤小鼠。消毒小鼠腹部皮肤，用 16 号针头无菌抽取腹水。也可剪开皮肤，将针头刺入腹膜抽取腹水。2000r/min 离心腹水 10min，弃去腹水，用 PBS 将腹水细胞调节到 5×10^6 个/ml，置 4℃。此细胞悬液可用于实验或继续接种小鼠腹腔传代，也可冻存备用。

步骤

1）接种肿瘤：取 20g 左右健康 BALB/c 小鼠或 BALB/c×C57BL/6 的 F_1 代小鼠。在小鼠前肢后方胁肋处或腹壁处消毒皮肤。用 4 号针头刺入皮下，潜行约 1cm，皮下注射 0.05ml（2×10^5～5×10^5）Meth A 细胞，形成皮丘。拔针头时应注意压迫皮丘和针眼之间，防止细胞漏出或滞留在针迹中形成多个肿瘤结节。

2）注射 TNF：约 7d，选肿瘤生长良好（直径 8～10mm），无自发出血坏死或感染的荷瘤小鼠为实验鼠。尾静脉注射 TNF 样品，约 24h 后观察肿瘤出血坏死情况。

3）判定结果：结果分为 4 级：出血坏死区域直径占整个肿瘤直径［（长径＋短径）/2］的 50%～75%为（+++），25%～50%为（++），<25%为（+），无出血坏死为（一或 0）。肿瘤完全消失达 4 周未再出现者为治愈。

也可将出血坏死的肿瘤组织冰冻切片，在电子显微镜或光学显微镜下观察出血坏死情况并拍照。

二、TNF 及其受体家族成员蛋白质的检测

检测和研究各种 TNF 及其受体蛋白的存在与含量的方法很多，最常用的是酶联免疫吸附试验（ELISA）。用 ELISA 检测蛋白质的详细操作步骤参见第十四章，用该法检测各种 TNF 时略有不同的是：用抗某种 TNF 特异性抗体（如抗 TNF-α 单抗）包被检测板，加入待测样本后，用另一种抗该种 TNF 特异性抗体（如兔抗 TNF-α 多抗）结合被包被抗体固定在板上的该种 TNF，最后加酶标二抗（如羊抗兔 Ig）和底物显色。

在第十四章还介绍了检测分泌细胞因子的细胞的 ELISPOT 实验。其原理是用一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子某一表位的小鼠来源的单克隆抗体）包被 96 孔板。加入经不同处理的细胞培养，让细胞产生细胞因子。产生的细胞因子立即被包被的抗体吸附在板上。洗去细胞后用另一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子另一表位的兔抗细胞因子多克隆抗体）结合已吸附在板上的细胞因子。最后加入酶标记的羊抗兔 IgG 抗体和底物显色。用可溶性底物显色，可根据颜色的深浅了解产生细胞因子的细胞数量；如果用不溶性底物显色，则可根据形成的斑点，直接计数产生细胞因子的细胞。

另外，用放射免疫技术或发光免疫技术检测各种液相中的细胞因子或可溶性受体的

含量（参见第十三章至第十五章），用流式细胞仪检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十五章），用 Western 印迹方法检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十二章），用免疫组织化学方法定位研究细胞因子或其受体在组织中的分布（参见第二十七章）。

三、TNF 及其受体家族成员 mRNA 的检测

RT-PCR 和定量 RT-PCR 技术检测各种细胞表达 TNF 或其受体 mRNA 的详细操作步骤（参见第十七章）。

第四节　干　扰　素

很多细胞因子具有抗病毒活性，其中最重要的是干扰素（interferon，IFN）。IFN 是一族具有抗病毒、调节细胞分化生长和调节免疫功能等活性的蛋白质。IFN 主要有 3 类：IFN-α、IFN-β 和 IFN-γ。IFN-α 和 IFN-β 又称为Ⅰ型 IFN，抗病毒作用较强，在几分钟内即可诱导细胞建立抗病毒状态，IFN-α 和 IFN-β 也较稳定，可以耐受 pH2 处理或 60℃ 1h 的加温。IFN-γ 又称为Ⅱ型 IFN，诱导细胞建立抗病毒状态需要数小时。用盐酸将样品的 pH 调节到 2，1～2h 后再用 NaOH 将 pH 调节到中性；或将样品在 60℃水浴中加温 1h，即可灭活 IFN-γ，这是区分 IFN-γ 和 IFN-α 或 IFN-β 的简单方法。

检测生物样品中干扰素含量最直接、常用、敏感的方法是检测其抗病毒活性，这也是本节介绍的重点。另有用 TF-1 细胞或 Daudi 细胞的增殖抑制试验检测 IFN-α、IFN-β 和 IFN-γ 调节细胞生长的活性。利用 IFN-γ 能诱导巨噬细胞产生一氧化碳（NO）的特点，检测 IFN-γ。利用 IFN 能作用于多种基因的启动子，从而诱导这些干扰素相关基因表达的特点。用分子生物学方法将这些启动子插入报道基因的上游，构建表达质粒，转入适当的细胞中。用含 IFN 的待测样本处理细胞后，检测报道基因的表达，从而了解样本中 IFN 的含量。

一、检测 IFN 和其他细胞因子抗病毒活性的方法

检测生物样品中 IFN 含量最常用、最敏感的方法是检测其抗病毒活性。其基本原理是：用细胞因子样品处理易感细胞，诱导细胞建立抗病毒状态，然后用适量病毒攻击细胞，评价病毒引起的细胞病变程度或病毒在细胞内复制的量，即可判断样品中细胞因子的生物活性。具体方法包括测定细胞因子抑制病毒诱导的细胞病变效应（cytopathic effect，CPE）、抑制病毒蚀斑形成（plaque formation）或抑制病毒产量等。

常用于检测抗病毒活性的细胞株包括 WISH、MDBK、A549、Hep2/c、RateC 和 L929 等细胞株。其中 WISH 细胞和 Hep2/c 细胞用于检测人 IFN，L929 细胞用于检测小鼠 IFN，RateC 细胞用于检测大鼠 IFN，MDBK 细胞则可用以检测许多种属的 IFN-α 和 IFN-β。

常用于攻击细胞的病毒对人体毒性较低，对靶细胞则感染性强，能引起明显的细胞病变。包括鼠脑心肌炎病毒（encephalomyocarditis virus，EMCV 或 Mengo virus）、滤

泡口炎病毒（vesicular stomatitis virus，VSV）、披膜病毒科甲病毒属的塞姆利基森林病毒（Semliki forest virus）和 Sindbis virus。这些病毒虽然对人的毒性低，但仍需做好个人和环境的防护。例如，在特定的工作区操作，操作时应穿工作服，戴口罩、手套；工作环境应经常用 1%过氧乙酸清洗消毒；接触病毒的物品和废弃物应当用 1%盐酸或 5%煤酚皂处理过夜，或煮沸消毒后才能清洗和作为生物污染物处理等。

病毒攻击细胞的时间和剂量随不同的细胞-病毒配对而异，应预先测定。通常 EMCV→Hep2/c 细胞需 20～24h，EMCV→A549 细胞需 30～48h，VSV→Wish［检测人（FN)］或 L929［检测小鼠（FN)］细胞需 24～36h。取预定时间内，能使未被保护的细胞产生 90%～100%病变的最小病毒量为宜。应在预定的时间内经常观察病毒对照孔，以确定反应到达病变终点（endpoint；90%～100%病变）的时间。

待测样品中可能含有能诱导内源性抗病毒效应的物质（如 IFN 诱生剂)，使结果呈假阳性。用不含 IFN 的同样来源的样品作对照，可以排除这种假阳性。待测样品中还可能含有细胞毒性物质，引起非病毒所致的细胞病变。因此在实验中增加一组不加病毒的同样系列稀释样品作对照，观察样品本身对细胞的细胞毒作用，以排除假阳性结果。

IFN 的抗病毒效应是通过诱导细胞产生抗病毒蛋白而发挥的间接作用，样品中如果存在 RNA 合成抑制剂或蛋白质合成抑制剂（如放线菌素 D)，就会抑制干扰素的抗病毒效应。进一步稀释样品通常可以消除抑制剂的作用，但对 IFN 含量低的样品应考虑这一因素。

IFN 抗病毒活性单位的定义是：能抑制 50%细胞病变或 50%病毒空斑形成效应的 IFN 最高稀释度的倒数。活性单位通常以每毫升样品中所含的单位数（U/ml）表达。IFN 的纯度则以每毫克蛋白质中所含的单位数（U/mg）或 IFN 的量（μg/mg）表达。

（一）微孔板检测法检测 IFN 和其他细胞因子的抗病毒活性

微孔板检测法简便、定量准确。此法还可以同时做抗体中和试验，并根据中和抗体的特异性和剂量可以定性 IFN 的种类和了解中和剂量：在系列稀释样品时增加一个平行稀释系列，在这个系列的各孔中加相同剂量的中和抗体，病毒攻击后同样处理细胞。结果，加中和抗体组的 IFN 抗病毒活性被特异性抑制。

材料与试剂

消化液（0.1%胰蛋白酶溶液，PBS 配制）

IFN 标准品：见表 9-1，可根据国际参考标准品标定各实验室自己的参考标准品

无血清 RPMI-1640 完全培养液

含 2%小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（2-1640 培养液）

含 5%小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（5-1640 培养液）

VSV（水泡口炎病毒）液（1×10^4 pfu/ml，用 2-1640 培养液配制）

结晶紫溶液（含 0.5%结晶紫、0.9% NaCl、2%甲醛、50%乙醇）

结晶紫脱色液（0.5mol/L NaCl、50%乙醇）

96 孔细胞培养板

24 孔细胞培养板

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）制备细胞悬液：取已长到90%汇合的 WISH 细胞，弃去培养液，加入 5ml 消化液，37℃消化 5min。用滴管吹打分散细胞，1500r/min 离心 5min，弃上清。

2）计数细胞，用 5-1640 培养液配制成 3×10^6 个/ml 细胞悬液，备用。

3）稀释和加样，取 1 块 24 孔细胞培养板，按下表加入 5-1640 培养液，并连续倍比稀释 IFN 标准品和待测样品：第 1 孔加 0.1ml 样品，混匀后吸 0.5ml 至第 2 孔，依此类推。第 8 孔混匀后吸 0.5ml 弃去。

稀释板孔号	1	2	3	4	5	6	7	8
5-1640 培养液/ml	0.9} ↘	0.5} ↘	0.5} ↘	0.5} ↘	0.5} ↘	0.5} ↘	0.5} ↘	0.5
IFN 样品/ml	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
样品稀释倍数	1∶10	1∶20	1∶40	1∶80	1∶160	1∶320	1∶640	1∶1280

注：↘表示混匀后取 0.5ml 加到下一孔。

4）将不同稀释度的样品分别加入 96 孔培养板内（0.1ml /孔），每稀释度 3 个复孔，并设细胞对照和病毒对照各 3 孔（各加 0.1ml 5-1640 培养液）。

5）每孔加 Wish 细胞悬液（0.1ml/孔）混匀。将培养板置 CO_2 培养箱内培养 24h。让细胞长到 90%以上汇合单层。

6）用 VSV 攻击：弃上清。每孔加 0.1ml VSV 液。细胞对照孔加 0.1ml 2-1640 培养液，置 CO_2 培养箱 18～24h。

7）用倒置显微镜观察病毒对照孔，病变细胞（细胞皱缩、变圆，坏死）达到 90%～100% 时即为培养终点，细胞对照孔细胞生长良好。用下列方法之一判定结果。

8a）用倒置显微镜初步判断：观察各孔，病变细胞变圆或不规则，细胞内出现空泡，进而细胞浮起，崩解，留下颗粒性碎片。以能保护 50% Wish 细胞不出现细胞病变的最高样品稀释度为 IFN 的效价，其倒数即为 IFN 的活性单位。

8b）结晶紫染色法：弃去培养上清，用 0.1ml PBS 洗涤各孔一次。每孔加 0.1ml 结晶紫溶液，室温中放置 5～10min。吸去染液，用自来水轻轻冲洗培养板，洗去结晶紫，直到病毒对照孔染料全部洗净。用蒸馏水再洗一次，晾干后备测。检测结果时，每孔加 0.1ml 结晶紫脱色液，室温脱色 2h。在 570nm 波长处测定光吸收（OD）值。以光吸收值对标准 IFN 稀释度作曲线，根据此曲线决定待测样品的相对含量。或者根据抑制 50%细胞病变的样品最高稀释度来决定样品的 IFN 活性单位。

8c）中性红染色法：用 0.1ml PBS 洗去病毒液和死细胞后，每孔加 50μl 2mg/ml 中性红染液（Hank's 液配制），继续培养 2h。用 0.2ml Hank's 液洗涤细胞 2 次；每孔加 0.1ml 脱色液（10ml 95% 乙醇，3.9ml 0.1mol/L HCl 和 6.1ml 0.1mol/L 柠檬酸二钠的混合液），在摇床中轻轻摇晃溶解 30min。在 550nm 波长处测定 OD 值。

注意事项

1）根据靶细胞类型决定每孔接种的细胞数，如 L929 细胞每孔 3×10^4 细胞、Hep2/c 细胞每孔 5×10^4 细胞。

2）标准品的稀释范围应与待测样品中 IFN 的稀释范围相近，否则无法比较。应根据样品中 IFN 的可能含量，选择适当的标准品用量。也可 3～10 倍系列稀释待测样品和标准品。全部操作都要无菌，必要时在稀释完成后用紫外线照射板 15～20min 杀菌。

3）病毒对照孔不加 IFN，作为判断培养终点用。细胞对照孔的细胞应全部生长良好。如果要了解待测样品中是否有细胞毒物质，可加一组对照孔（只加 IFN 样品不加病毒的对照）；如果要进一步了解样品中细胞毒物质的含量，可再加一个待测样品的稀释系列，该系列以后不加病毒，实验结束时直接染色计数或观察细胞的死亡情况。

4）加病毒攻击细胞前，要让细胞中 IFN 的作用下建立抗病毒状态，至少需要 12h（IFN-α 和 IFN-β）或 24h（IFN-γ）。加病毒攻击细胞后的培养时间为 24～48h，需根据病毒对照孔的细胞病变情况确定。

5）小心保护自己和环境。废弃的含病毒的液体应小心吸入专用储液瓶中以防污染环境。

6）常用结晶紫染色法判定结果。在染色固定时和洗涤时应尽量轻柔，防止水流冲走贴壁的活细胞，影响检测结果。直接观察法受人为的因素干扰，误差较大。

7）本实验亦可将细胞先接种到培养板中，待细胞长到 90%以上汇合单层后（约 24h），再加稀释的样品培养 24h。此时用 2-1640 培养液稀释样品，较少的血清可防止细胞生长过度。

附：29 细胞传代病毒和制备病毒保存液

VSV、Mengo 和 EMCV 等病毒都能在小鼠的 L929 细胞中生长繁殖，可用 L929 细胞传代病毒和制备浓缩病毒保存液。

材料与试剂

含 10%小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（10-1640 培养液）

含 1%小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（1-1640 培养液）

病毒液（2×10^6pfu/ml，1-1640 培养液配制）

直径 100mm 的培养皿或 $75cm^2$ 的培养瓶

步骤

1）用 10-1640 培养液，在直径 100mm 的培养皿或 $75cm^2$ 的培养瓶中培养 L929 细胞到细胞汇合。

2）倒去培养液，每个培养皿或瓶中加 1ml 病毒液（2×10^6pfu/ml），在 CO_2 培养箱中培养 1h。

3）吸去病毒液，加 5ml 1-1640 培养液，继续培养 20～24h。

4）吹打细胞后收集上清，4℃下 10 000g 离心 10min。收集上清，分装，－70℃保存。

5）用病毒空斑形成实验滴定病毒滴度。

注意事项

1）加病毒液后要摇晃培养皿或瓶，使全部细胞均能接触到病毒液。

2）继续培养的时间通常是 20～24h，应观察细胞，以达到 90%～100%细胞病变的时间为终点。

3）小心保护自己和环境。废弃的含病毒的液体应小心吸入专用储液瓶中以防污染环境。

（二）用病毒空斑形成试验滴定病毒滴度

检测病毒滴度的方法有很多，常用空斑形成试验又称噬斑形成试验滴定病毒滴度。将 10 倍系列稀释的待测病毒液加在敏感细胞单层上，作用 1h，让病毒感染细胞。吸去病毒液后在细胞单层上覆盖营养琼脂糖。病毒在细胞内复制、裂解细胞并再感染和裂解周围细胞，在细胞单层上形成死亡细胞的空斑或称噬斑。理论上 1 个噬斑代表待测病毒液中的 1 个感染性病毒，称为 1 个空斑形成单位（pfu）。有时多个病毒可能同时感染 1 个细胞，形成 1 个噬斑，仍算作 1 个 pfu。为了避免同时感染，待测病毒液的稀释度应当足够大。

也可以用检测病毒的血凝素、神经氨酸酶的方法间接测定病毒滴度，这些方法都很敏感、准确，但是较为费时费力，不太适合检测大量样品。

材料与试剂

PBS

1%琼脂糖（蒸馏水配制，高压灭菌）

含 10%胎牛血清的、2 倍浓缩的 MEM 培养液（2×MEM 培养液）

中性红溶液（0.03%中性红溶于 PBS 中）

60mm 直径的培养皿

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）接种 1×10^6 个 L929 细胞于 60mm 直径的培养皿中，在 CO_2 培养箱中培养到细胞汇合成单层。

2）用 PBS 10 倍系列稀释病毒样品，通常从 10^{-5}稀释到 10^{-13}。

3）吸去各培养皿中的培养液，每培养皿中加 0.25ml 稀释病毒液，每个稀释度 3 个培养皿。病毒液加在培养皿的中央，然后水平摇动培养皿使液体覆盖全部细胞。在 CO_2 培养箱培养 1h，其间水平摇动培养皿几次，使液体均匀分布。

4）溶解 1%琼脂糖并保温于 45℃。将预温到 37℃的 2×MEM 培养液与 1%琼脂糖溶液等量混合。快速吸去培养皿中的病毒液，每培养皿中加 7ml 琼脂糖混合液，室温中固化 5min。倒置培养皿于 CO_2 培养箱中。

5）培养 14h 即可出现病毒噬斑，一般 24～36h（EMCV 和 Mengo）或 48h（VSV）即可清楚地看见噬斑。用 2ml 中性红溶液染色琼脂 37℃ 1h。倒去染液，计数培养皿中全部噬斑。

6）病毒滴度（pfu/ml）＝ 空斑数×4×稀释倍数。

注意事项

1）加病毒液时一定要使液体覆盖全部细胞。

2）可用低熔点琼脂糖代替普通琼脂糖，加琼脂糖的目的是使病变细胞释放的病毒不能移动，有利于识别空斑。

3）在达到预定的培养时间前，应在显微镜下观察噬斑大小，及时计数噬斑。防止不断增大的噬斑相互融合，影响计数。

4）计数空斑时，应选择有 100～200 个空斑的培养皿计数，并以上一个和下一个稀释度的培养皿中的空斑数作参考。

5）小心保护自己和环境。废弃的含病毒的液体应小心吸入专用储液瓶中以防污染环境。

二、检测 IFN 生物学活性的其他方法

（一）用细胞株检测 IFN 生物学活性

检测 IFN 的抑制细胞生长活性可能会比检测抗病毒活性更能反映 IFN 的抗肿瘤和免疫调节活性。如果用不同稀释度的含有可溶性 IFN 受体的样品与定量 IFN 相互作用（37℃ 1h），再检测反应物中的细胞株生长抑制活性，可以了解样品中可溶性 IFN 受体的含量。

IFN 生物学活性的 TF-1 细胞增殖抑制实验可以检出 200fg（0.04IU）的 IFN-α 或 IFN-β，或 100fg（0.02IU）的 IFN-γ，比用检测 IFN 抗病毒活性（EMCV→2D9 细胞）的方法要敏感 10～100 倍。用于检测的细胞株是人红白血病细胞 TF-1。TF-1 细胞对许多细胞因子都有增殖反应，此实验用 GM-CSF 或 EPO 诱导 TF-1 细胞产生最大增殖反应以后，再检测 IFN 的生长抑制效应，所以不受样品中其他促增殖细胞因子（IL-3、GM-CSF 等）影响。但是 TNF-α 和 TGF-β 对细胞也有生长抑制作用，应注意排除。IFN-γ 不能抑制细胞因子诱导的 TF-1 细胞生长。

材料与试剂

含 5%胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（5-1640 培养液）

无血清 RPMI-1640 培养液

^{3}HTdR

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）在 TF-1 细胞生长到 2×10^{5} 个/ml 浓度时收集细胞。用无血清 RPMI-1640 培养液洗涤细胞 2 次。

2）用含 500pg/ml 重组人 GM-CSF 的 5-1640 培养液将细胞配成 1×10^5 个/ml 的浓度。取 96 孔细胞培养板，每孔加 0.1ml 细胞悬液。

3）用 5-1640 培养液系列稀释 IFN 待测样品和标准品，每孔加 0.1ml 稀释样品或标准品，阴性对照孔中加 0.1ml 稀释液。每个稀释度 3 个复孔。在 CO_2 培养箱中培养 24～48h。

4）用 ^{3}HTdR 掺入法或 MTT 检测法检测细胞数（参见本章第二节）。根据标准品的标准曲线判定待测样品中 IFN 的含量。

注意事项

TF-1 细胞株的培养：TF-1 细胞培养于含 2ng/ml 重组人 GM-CSF 的 5-1640 培养液中，在 CO_2 培养箱中培养到 2×10^5 细胞/ml。将细胞稀释到 5×10^4 个/ml，继续分瓶培养。

（二）检测 IFN-γ 诱导 NO 的活性

用小鼠 IFN-γ 处理小鼠巨噬细胞株 RAW264.7，通过检测培养上清中的 NO_2^- 浓度，判定细胞释放的 NO，计算 IFN-γ 的生物学活性。此法检测 0～10U/ml IFN-γ 时成线性，2～100U/ml IFN-γ 时成对数线性。此法不能检出人 IFN-γ，不能检出小鼠 IL-2、IFN-α、IFN-β、IL-6、TNF，这些细胞因子也不能增强小鼠 IFN-γ 诱导 NO 产生的作用。但 LPS 能诱导 RAW264.7 细胞产生 NO，且与 IFN-γ 有协同作用。

材料与试剂

完全 Williams E 培养液

3mmol/L 单甲基精氨酸（N^G-monomethyl-L-arginine）

Griess 试剂

96 孔细胞培养板

酶联检测仪

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）用完全 Williams E 培养液培养小鼠 RAW264.7 细胞。用细胞刮刮下培养 2～3d 的、生长良好的细胞，洗涤后用完全 Williams E 培养液配成 1×10^6 个/ml。

2）取 96 孔细胞培养板，每孔加 0.1ml 细胞悬液，置 CO_2 培养箱中培养 4～6h。

3）加入 0.1ml 用完全 Williams E 培养液倍比稀释的 IFN-γ 样品，阴性对照系列加入 0.1ml 用含 3mmol/L 单甲基精氨酸的完全 Williams E 培养液倍比稀释的 IFN-γ 样品。每种处理重复 3 孔。置 CO_2 培养箱中培养 24h。

4）取 0.1ml 培养上清，对应转移到另一块 96 孔酶联检测板中。

5）在此 96 孔酶联检测板中，每孔加 0.1ml Griess 试剂。另设标准品对照，每孔加 0.1ml 各含 0、1μmol/L、2μmol/L、4μmol/L、8μmol/L、16μmol/L、32μmol/L $NaNO_2$ 的水溶液和 0.1ml Griess 试剂混合。

6）在酶联检测仪上，550nm 波长处测定吸光度（OD）值。根据标准品的标准曲

线判定上清中的 NO 含量，进而决定样品中的 IFN-γ 含量。

注意事项

1）IFN-γ 样品中可能含有脂多糖（LPS），可用下法去除：在 4℃ 中用 1ml 多黏菌素 B 交联葡聚糖柱（400μl polymyxin B agarose，Sigma 公司）层析 500μl 含 LPS 的 IFN-γ 样品，收集第 7 滴及以后的流出液（前 6 滴为柱床中的平衡液，约 150μl，弃去），此流出液中的 LPS 已被层析柱吸附；再在细胞培养液中加入多黏菌素 B 到 10U/ml，可完全抑制 LPS 诱导 NO 产生的作用，对 IFN-γ 的诱导作用没有影响。

2）完全 Williams E 培养液的配制：含 2mmol/L 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100μg/ml 链霉素和 10%胎牛血清的 Williams E 培养液（Gibco/BRL 公司）。

3）单甲基精氨酸能抑制可被 IFN-γ 诱导的 NO 合成酶。在本实验中作为阴性对照。

4）Griess 试剂的配制：1 份用 H_2O 配制的 1%二盐酸萘乙二胺（naphthylethylenediamine dihydrochloride）和 1 份用 5% H_3PO_4 配制的 1%对氨基苯磺酰胺（sulfanilamide）的混合液。

三、IFN 蛋白质的检测

检测和研究 IFN 及其受体蛋白的存在和含量的方法很多，最常用的是酶联免疫吸附试验（ELISA）。用 ELISA 检测蛋白质的详细操作步骤参见第十四章，用该法检测 IFN 时略有不同的是：用抗 IFN 特异性抗体（如抗 IFN 单抗）包被检测板，加入待测样本后，用另一种抗 IFN 特异性抗体（如兔抗 IFN 多抗）结合被包被抗体固定在板上的 IFN，最后加酶标二抗（如羊抗兔 Ig）和底物显色。

在第十四章还介绍了检测分泌细胞因子的细胞的 ELISPOT 实验。其原理是用一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子某一表位的小鼠来源的单克隆抗体）包被 96 孔板。加入经不同处理的细胞培养，让细胞产生细胞因子。产生的细胞因子立即被包被的抗体吸附在板上。洗去细胞后用另一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子另一表位的兔抗细胞因子多克隆抗体）结合已吸附在板上的细胞因子。最后加入酶标记的羊抗兔 IgG 抗体和底物显色。用可溶性底物显色，可根据颜色的深浅了解产生细胞因子的细胞数量；如果用不溶性底物显色，则可根据形成的斑点，直接计数产生细胞因子的细胞。

另外，用放射免疫技术或发光免疫技术检测各种液相中的细胞因子或可溶性受体的含量（参见第十三～十五章），用流式细胞仪检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十五章），用 Western 印迹方法检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十二章），用免疫组化方法定位研究细胞因子或其受体在组织中的分布（参见第二十七章）。

四、IFN mRNA 的检测

RT-PCR 和定量 RT-PCR 技术检测各种细胞表达 IFN 或其受体 mRNA 的详细操作步骤（参见第十七章）。

第五节　趋化因子

一、趋化因子趋化活性的检测

(一) 检测趋化因子的琼脂糖小滴化学动力学试验

琼脂糖小滴化学动力学试验用于检测细胞因子诱导的细胞化学增活现象。本法以中性粒细胞为靶细胞，研究细胞因子对中性粒细胞的化学增活作用。细胞因子对其他细胞的化学增活作用也可用同样方法检测。

从外周血中分离中性粒细胞

从外周血中分离中性粒细胞的方法主要是沉降法，此法简单、分离效果较好。沉降介质能促进红细胞聚集而加速沉降，从而达到分离的目的，主要有葡聚糖、明胶和羟乙基淀粉等。

如果先用淋巴细胞分离液分离去除外周血单个核细胞（PBMC），再用沉降法将粒细胞与红细胞分开，则得到的粒细胞更纯。用淋巴细胞分离液离心分离 PBMC 时，弃去液体（包括血浆、PBMC 和淋巴细胞分离液），沉淀物的黄色上层是粒细胞，下层是红细胞。取上层和部分红细胞，用下述沉降法分离多核粒细胞。

用葡聚糖分离中性粒细胞

材料与试剂

6%葡聚糖-70 [Dextran-70，用生理盐水配制（质量体积比）]

0.2% NaCl 和 1.6% NaCl

含 30mmol/L pH7.4 Hepes 的 MEM 培养液（MEM 培养液）

步骤

1）取 20ml 新鲜的正常人肝素抗凝静脉血，或经淋巴细胞分离液分离的粒细胞，与 5ml 6% 葡聚糖-70 混匀，置室温 60min 使分层。

2）取上层，上层含 70%～80%中性粒细胞，200*g* 离心 10min，去上清。

3）用 10ml 0.2% NaCl 悬浮细胞，放置 30s，溶解红细胞。快速加入 10ml 1.6% NaCl，混匀，200*g* 离心 10min，去上清。

4）悬浮细胞于 20ml MEM 培养液中，200*g* 离心 10min，去上清。

5）计数细胞，用 MEM 培养液将细胞配成 2×10^8～4×10^8 个/ml 备用。

注意事项

用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞时，粒细胞位于淋巴细胞分离液与沉淀红细胞之间，又称为棕黄层细胞。将此层细胞连同少量红细胞一起吸出，用 PBS 调整到原血体积，再加葡聚糖-70。

用明胶分离中性粒细胞

材料与试剂

PBS

25%明胶液（生理盐水配制）

红细胞裂解液（0.075% NH_4Cl，20mmol/L Tris-HCl pH7.4）

3.6% NaCl

2% BSA-PBS

含 5% BSA 的 RPMI-1640 培养液

50ml 量筒

步骤

1）取 10～20ml 新鲜人肝素抗凝静脉血或用淋巴细胞分离液分离的粒细胞，加 2 倍量 PBS。

2）取 10ml 25%明胶液置 50ml 量筒中，小心加入 20ml 细胞悬液，使分层。

3）37℃放置 30min，让红细胞沉降。吸取上层液，500*g* 离心 8min。去上清。

4）用 20ml 红细胞裂解液悬浮细胞 30s，溶解红细胞。迅速加 8ml 3.6% NaCl 溶液，混匀，250*g* 离心 8min。去上清。

5）用 2% BSA-PBS 洗涤细胞 2 次，每次 250*g* 离心 5min。

6）将细胞悬浮于 1ml 含 5% BSA 的 RPMI-1640 培养液中，台盼蓝拒染法检测细胞活力。再用同样培养液将细胞配成 3×10^6 个/ml，立即用于趋化实验。

注意事项

用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞时，粒细胞位于淋巴细胞分离液与沉淀红细胞之间，又称为棕黄层细胞。将此层细胞连同少量红细胞一起吸出，用 PBS 调整到原血体积，再加到明胶液上。

琼脂糖小滴化学动力学试验

此试验亦可用以检测其他有趋化作用的因子的化学增强作用，如白三烯（leukotriene B4）和补体（C5a）。

材料与试剂

0.8%（质量体积比）琼脂糖（无菌蒸馏水配制）

2×细胞培养液（含 20%热灭活人血清，60mmol/L pH7.4 Hepes，50U/ml 庆大霉素的 2 倍浓缩的 MEM 培养液）

45℃水浴

96 孔平底细胞培养板

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）加热溶化 0.8%琼脂糖，置 45℃水浴中保温。在 45℃中预温 2×细胞培养液。

2）在 45℃中，将琼脂糖和 2×细胞培养液等量混匀，成为 0.4%琼脂糖/MEM

溶液。

3）在 37℃中，将预温到 37℃的用沉降法制备的粒细胞悬液与 0.4% 琼脂糖/MEM 溶液等量混匀。最终浓度为含粒细胞 $1\times10^8\sim2\times10^8$ 个/ml。

4）向置于冰上的 96 孔平底细胞培养板的孔中央滴入混悬液，每孔 4μl，使成小滴状。继续置于冰上 2～3min 使琼脂糖小滴固化。

5）用细胞培养液倍比稀释趋化因子（如 IL-8）的标准品和待检样品，标准品从 100ng/ml 稀释到 0.5ng/ml，共 8 个稀释度。每个稀释度需要 3 个复孔，每孔加 0.1ml。阴性对照孔加 0.1ml 细胞培养液。注意不要破坏已固化的琼脂糖小滴。

6）在 CO_2 培养箱中培养 2h。

7）用倒置显微镜观察各孔（投射显微镜更佳）。测量细胞从琼脂糖小滴向外迁移的半径（从琼脂糖小滴边缘到最远的 3 个细胞距离的平均值），减去细胞的自身运动（阴性对照孔）半径，即为 IL-8 诱导的随机移动。绘制标准 IL-8 浓度对移动半径的标准曲线，与标准曲线比较即可得到待检样品中 IL-8 的含量。

（二）检测趋化因子趋化作用的琼脂糖趋化试验

琼脂糖中的趋化试验在培养皿中进行，以细胞在琼脂糖中向趋化因子方向的迁移距离检测趋化因子的存在和含量。所以试验可同时检测多个待测样品，但由于不能准确定量，通常只在预实验或粗筛时用，精确定量还需要用下述的微孔小室中的趋化实验。根据细胞类型（如中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞等），此实验可检测有不同的趋化因子，细胞越纯，结果越准确。

由于趋化因子的特异性活性很高，某些趋化因子在高浓度时促进细胞趋化的作用反而降低，所以待测样品常需连续稀释（5 倍或 10 倍系列稀释）以获得最适剂量的滴定曲线。每次实验都需用标准品作标准曲线，因为不同来源或不同活力靶细胞的趋化能力差异很大。

趋化试验中的阳性对照最好用细胞因子的标准品。但一种强趋化物质甲酰甲硫氨酰亮氨酰苯丙氨酸（formylmethionyl-leucylphenylalanine，fMLP）常用作趋化实验中的阳性对照。如果在实验中最适剂量的 fMLP（如 10^{-7}mol/L）能获得很好的重复性，那么也可在定性实验中用单剂量的多个重复（每一块琼脂板设一个阳性对照）对照，此时以 fMLP 诱导的趋化作用为 100%，细胞因子的趋化活性则用与 fMLP 相比的百分率表示。

材料与试剂

琼脂糖

10×DMEM 培养液：2ml 胎牛血清，适量谷氨酰胺和碳酸氢钠，2ml 10 倍浓缩的 DMEM 培养液，加水至 10ml

0.5g/ml 人血清白蛋白（Hank's 液配制）

10^{-5}mol/L 甲酰甲硫氨酰亮氨酰苯丙氨酸（fMLP）

May-Grunwald-Giemsa 染液

甲醇

37%甲醛

直径 60mm 的培养皿

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1. 琼脂平皿的制备

1）取 0.18g 琼脂糖加入 10ml 无热源蒸馏水中，煮沸 15min，完全溶化琼脂糖，置 50℃。

2）预热 10ml 10×DMEM 培养液到 50℃，在 50℃中将 10ml 琼脂糖与 10ml 培养液混匀。

3）在直径 60mm 的培养皿中加 6ml 上述混合液，室温放置 30min 自然凝固。密闭保存于 4℃以备后用。

4）按图 9-3 在琼脂平皿上打 6 排孔，每排 3 个内径为 3mm 的孔，在 CO_2 培养箱中预温。

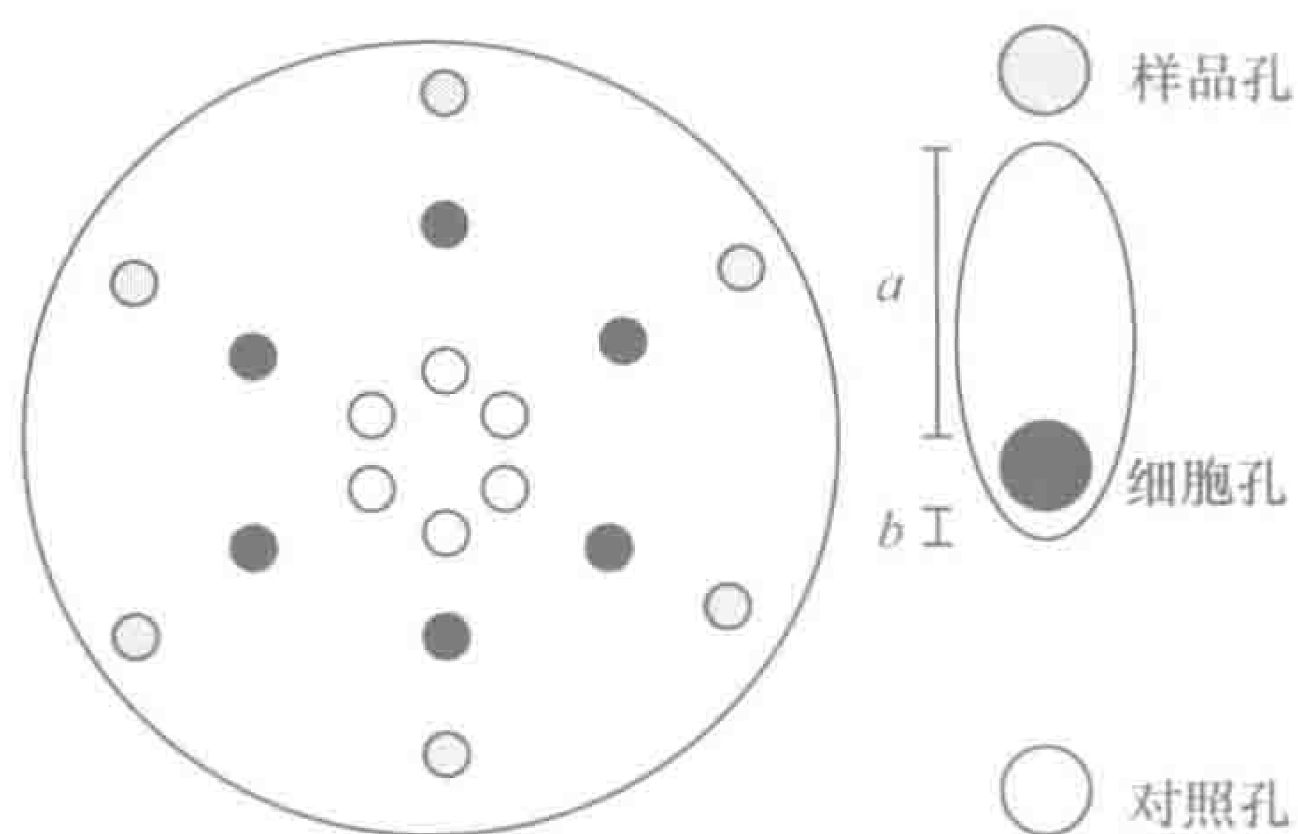


图 9-3　琼脂糖中的趋化试验

左侧：在平皿上打孔示意图，6 排 3 联孔，包括内侧孔（对照孔），中间孔（细胞孔）和外侧孔（样品孔）。右侧：趋化结果示意，b 代表随机运动，a 减 b 代表趋化运动

2. 琼脂糖中的趋化实验

1）在细胞孔中加入 10μl 细胞悬液（如 3×10^5 个中性粒细胞），对照孔中加入 10μl 0.5g/ml 人血清白蛋白作为阴性对照，样品孔中加入 10μl 系列稀释的标准品或待测样品或 10^{-5}mol/L fMLP。每个稀释度在不同的平皿中重复 2～3 次。

2）在 CO_2 培养箱中培养 2h。

3）每个平皿加 3ml 甲醇终止反应，室温放置 30min，小心吸去液体。

4）每个平皿加 3ml 37%甲醛，室温固定细胞 30min，小心吸去液体。

5）小心取出琼脂糖凝胶，用 May-Grunwald-Giemsa 染液染色细胞。

6）计数迁移的细胞数或测量细胞迁移的距离（图 9-3 右），用细胞向样品孔趋化的数量或距离（a）减去细胞向对照孔随机移动的数量或距离（b）即是趋化因子的趋化活性。趋化活性亦可表达为 $(a-b)/b$。如果样品经过梯度稀释，可以做出滴定曲线。取最大活性一半处的稀释度与标准滴定曲线比较，即可得到定量的结果。

注意事项

1）培养时间根据不同的细胞而异，如单核细胞需要约3h。具体时间的确定是在倒置显微镜上观察，当细胞接近外侧孔的边缘时即可终止反应。如继续培养，细胞的趋化作用停止而随机运动仍继续，因此结果的敏感性和准确性都会受到影响。

2）细胞迁移的距离（a 或 b）以从孔边缘到迁移最远的3个细胞的平均距离为准。

3）染液配制和染色。

（1）将2.5g May-Grunwald粉剂溶于1L甲醇中，室温中密封老化1个月，滤过备用。

（2）将0.5g Giemsa粉剂置研钵中，加少量甘油研磨融化，用剩余甘油（共33ml）将染料洗入棕色容器中，56℃放置2h，加入33ml甲醇混匀保存。使用前用PBS稀释10倍（1∶9），立即应用。

（3）室温中，将琼脂糖凝胶置May-Grunwald染液中染色10min，PBS洗去染液。再用Giemsa染液染色20min，PBS洗去染液。丙酮浸泡2次脱水，每次30min，不要让凝胶干。

（4）透明：用丙酮/二甲苯（2∶1）浸泡3次，丙酮/二甲苯（1∶2）浸泡3次，二甲苯浸泡2次，每次均为10min。透明后置玻片上，加盖盖玻片，用树脂胶封片保存。

（三）检测趋化因子趋化作用的微孔小室趋化试验

微孔小室中的趋化试验是根据靶细胞能够趋化性主动迁移，穿过一定孔径的滤膜而设计的。滤膜将小室分隔成上、下两个部分，靶细胞在上，趋化因子在下，趋化因子通过滤膜形成梯度，细胞沿着梯度穿过膜孔黏附在膜的下表面。计数滤膜下表面的细胞数即可测出趋化因子的趋化能力。

此试验是Boyden首先报道，Boyden室是单孔小室，由于小室之间的差异，实验误差较大。目前有48孔96孔的趋化试验装置，可以方便、快速、准确地检测趋化活性。

应根据靶细胞的大小选择滤膜的材料和孔径。纤维素脂（cellulose ester）滤膜（150μm厚）适用于检测多种细胞的趋化深度，单核细胞和淋巴细胞用8μm孔径，中性粒细胞用3～5μm孔径。聚碳酸（polycarbonate）膜广泛用于检测趋化穿过膜的细胞数，单核细胞用5～8μm孔径的PVP（polyvinyl pyrrolidone）聚碳酸膜，中性粒细胞用3～5μm孔径的无PVP聚碳酸膜，内皮细胞趋化试验常用的滤膜是无PVP聚碳酸膜（5μm孔径，13mm直径，10μm厚）。黏附能力较弱的细胞的趋化实验需要用经明胶或纤黏素处理的无PVP聚碳酸膜（5μm孔径），以免淋巴细胞穿过膜后落入下室。将膜浸在0.5mol/L乙酸中2min，用PBS洗去乙酸，在0.01%明胶溶液中浸24h，自然干燥后用。

用Boyden室检测趋化因子诱导的趋化活性

Boyden室分为上、下两部分，趋化因子等刺激物置下室中，靶细胞在上室中，中

间由微孔滤膜隔开。试验时，靶细胞穿过微孔滤膜向刺激物浓度高的下室运动。Boyden 室是单孔小室，实验时各小室分别操作，实验结果误差较大。

材料与试剂

含 0.5mg/ml 人血清白蛋白的 RPMI-1640 培养液（培养液）

70%甲醇

Diff-Quick 染料（Harleco 公司，USA）

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）用培养液将如上分离的中性粒细胞配成 2×10^6 个/ml。

2）向 Boyden 室的下室中加 0.2ml 用培养液稀释的趋化因子样品，避免产生气泡。

3）将微孔滤膜的光面向下盖在样品液面上。将 Boyden 室的上部放在膜上，旋紧后形成上室。在上室中加 0.2～0.4ml 细胞悬液。

4）在 CO_2 培养箱中培养 6h。

5）吸去上室中的培养液，用棉花小心擦净滤膜上表面的未迁移的细胞。旋下 Boyden 室的上部，用镊子取下滤膜，光面（有迁移细胞）向上置于玻片上。

6）用 70%甲醇固定黏在膜上的细胞，用 Diff-Quick 染料染色细胞，将膜晾干，在高倍镜或油镜下计数 10 个视野中的全部细胞。结果用 3 个重复室细胞数的平均值（$\bar{x}\pm s$）表达。

注意事项

1）操作时小心下层液面和膜之间不能有气泡，否则影响细胞迁移。

2）培养时培养液中不加血清是为了防止血清中可能存在的趋化活性。培养时间因细胞种类而不同，通常为 2～6h，应预先测定。

3）滤膜上表面的未迁移的细胞要尽量擦净，旋转 Boyden 室的上部时要防止滤膜皱褶。

（四）用微孔板检测趋化因子诱导的趋化活性

用微孔板检测趋化活性较简便、快速，一次能检测较大量样品。微孔板有 48 孔和 96 孔两种，均有底板、盖板两部分和固定装置。微孔板的底板孔容积较小，有利于小量样品的检测，所加样品的量根据不同的板孔而异，以加满孔为度。用于检测趋化活性的微量板，国产和进口的均有供应，只要密闭性良好均可选用。

材料与试剂

含 0.5mg/ml 人血清白蛋白的 RPMI-1640 培养液（BSA-1640 培养液）

微孔板检测趋化活性用微孔板和滤膜

70%甲醇

Diff-Quick 染料

48 孔或 96 孔趋化微孔板

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）按第一章的方法分离 PBMC 或小鼠脾细胞，用 BSA-1640 培养液将细胞配成 1.5×10^6 个/ml。

2）用 BSA-1640 培养液梯度稀释待测样品和标准品，向微量板小室的底板各孔中加 27μl 样品，在底板之上复以 5μm 孔径的 PVP 聚碳酸膜（光面向下），小心地让整张膜依次与各孔样品溶液接触，覆盖平整，膜和液体之间不能有气泡，也不能让各孔中的液体相混。盖上顶板并固定牢固。

3）在顶板各孔中加入 50μl 细胞悬液（约 75×10^3 个细胞），在 CO_2 培养箱中培养 2h，让细胞从膜的上面向下趋化运动。

4）弃去上层孔中的细胞液，小心卸下顶板，固定膜。用 PBS 湿润微孔滤膜的上表面，小心用棉签擦去没有迁移的细胞。

5）小心揭下膜，翻转膜，将膜的下表面（此面有迁移的细胞）向上，置玻片上。

6）用 70%甲醇固定粘在膜下表面的细胞。用 Diff-Quick 染料染色细胞。

7）将膜置于玻片上晾干。在高倍镜或油镜下每孔计数 5 个视野中的全部细胞。

8）趋化因子的活性有几种表达方式：①如有标准品并做了梯度稀释，可得到标准曲线（趋化细胞数对稀释度作图），待测样品的结果与标准曲线对照即可得到相对活性。②以参考趋化物质（如 fMLP）的最大趋化细胞数为 100%，各样品与其相比得到相对百分率（%），用此百分率表示趋化活性。③趋化指数（chemotactic index，CI）指迁移到待测样品液的细胞数和迁移到阴性对照液的细胞数的比值。④如果用的是纤维素脂滤膜，也可以用测量细胞进入滤膜的深度（迁移距离）来评价趋化因子的活性。

注意事项

1）培养时培养液中不加血清是为了防止血清中可能存在的趋化活性。培养时间因细胞种类而不同，通常为 2～6h，应预先测定。

2）滤膜上表面的未迁移的细胞要尽量擦净，固定和卸下装置时，要防止滤膜皱褶。

（五）用显色反应计数趋化的中性粒细胞

中性粒细胞中含有过氧化物酶，可以用这种酶作为测定细胞数的标志酶。在中性粒细胞趋化实验［步骤 3)］后，将微孔板 2000r/min 离心 10min，将趋化的细胞离心到孔底，加入邻联茴香胺（*o*-dianisidine）显色，在酶联检测仪中测定颜色反应，确定趋化的细胞数。此试验可以一次自动检测大量样本，不必在显微镜下计数，节省了时间。显色反应的最低检出数是 500 个细胞，在 500 个细胞到 1.6×10^4 细胞以上时，细胞数与显色反应成直线关系。也可以用检测中性粒细胞释放的β-葡萄糖醛酸来确定中性粒细胞的量。

本实验用常规的 96 孔细胞培养板配合趋化装置（如 NeuroProbe 公司产品，包括与 96 孔细胞培养板各孔对应的顶板、聚硅氧烷垫片、与细胞培养板边缘宽度相同的框

架、可以放置96孔细胞培养板的底托和固定装置）进行趋化实验。本实验需要较多的样品（约0.4ml）。用细胞培养液将细胞配制成2.5×10^6个/ml。

材料与试剂

RPMI-1640完全培养液

2μm孔径的聚碳酸膜（polycarbonate filter，8.5cm×12.8cm）

溶解液（0.2% Triton X-100，蒸馏水配制）

反应液［0.34mmol/L邻联茴香胺，0.02%（体积比）的30% H_2O_2，0.05mol/L Na_2HPO_4，0.05mol/L pH5.0的枸橼酸钠缓冲液，新鲜配制］

96孔细胞培养板及相应的趋化装置

多孔加样器

37℃，5% CO_2的饱和水汽CO_2培养箱

步骤

1）将96孔细胞培养板放在趋化装置的底托中。整个装置在37℃中预温过夜。

2）用RPMI-1640完全培养液系列稀释待测样品或标准品。在96孔细胞培养板的每孔加0.41ml样品（所加样品的量以加满孔为度），每种样品重复2～3孔。在培养板之上复以2μm孔径的聚碳酸膜。放上框架，盖上聚硅氧烷垫片和顶板并固定牢固。

3）用0.2ml RPMI-1640完全培养液洗涤各孔，洗去固定时可能滤入上孔的样品溶液。在顶板各孔中加0.2ml（约5×10^5个）细胞悬液。

4）置CO_2培养箱中培养1～2h，让细胞从膜的上面向下趋化运动。

5）吸去上孔中的细胞，用培养液洗涤各孔。卸下顶板，连框架一起取出膜和细胞培养板（框架、膜和培养板保持一体）。用PBS湿润微孔滤膜的上表面，小心擦去没有迁移的细胞。连框架一起离心细胞培养板，250*g*离心15min，将趋化到膜下表面的细胞离心入细胞培养板的孔中。

6）用多孔加样器穿过膜，吸出0.1～0.2ml孔中的液体。揭去膜，小心吸去孔中剩余的液体。

7）每孔加40μl溶解液溶解细胞5min。每孔加160μl反应液，室温中振荡10min。

8）在酶联检测仪上，405nm波长处测定各孔中的吸光度（OD）值。

注意事项

1）放置滤膜时，小心地让膜与样品溶液接触，不能有气泡，也不能让各孔中的液体相混。框架可以防止取培养板时滤膜移动。

2）培养时培养液中不加血清是为了防止血清中可能存在的趋化活性。培养时间因细胞种类而不同，通常为1～6h，应预先测定。

3）滤膜上表面的未迁移的细胞要尽量擦净。固定和卸下装置时，要避免滤膜发生皱褶。

4）对照和结果判定：每一块96孔板中都设无细胞阴性对照（上下孔均加RPMI-1640）排除培养液中可能存在的过氧化物酶活性；无趋化因子阴性对照

（下孔加 RPMI-1640，上孔加细胞悬液）排除细胞的随机运动。各孔实际平均OD值＝最后测定的各孔平均OD值－无细胞阴性对照孔的平均OD值－无趋化物阴性对照的平均OD值。

5）同样稀释的标准品系列应当有两组：一组在趋化试验后加底物检测过氧化物酶活性；另一组在趋化试验后用0.1ml RPMI-1640培养液悬浮细胞，计数每孔中趋化的细胞数。两组比较就可以得到不同OD值所对应的细胞数。结果用迁移到下孔的细胞数表达；或用迁移入下孔的细胞占加入上孔细胞的百分比表达；或者与标准曲线对照，得到相对活性；也可以以fMLP诱导的最大趋化细胞数为100％，用相对百分率（％）表示各样品的趋化活性。

（六）IL-16诱导T淋巴细胞趋化实验

IL-16即淋巴细胞趋化因子（LCF）。它可以诱导$CD4^+$ T细胞发生趋化运动。检测IL-16趋化活性的方法如下。

材料与试剂

含0.5mg/ml人血清白蛋白的RPMI-1640培养液（BSA-1640培养液）
微孔板检测趋化活性用微孔板和滤膜
70％甲醇
Diff-Quick染料
48孔或96孔趋化微孔板
37℃，5％ CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）按第四章的方法分离T细胞或$CD4^+$ T细胞，用BSA-1640培养液将细胞配成5×10^6～10×10^6个/ml。

2）取微量板，底板各孔加32μl系列稀释的标准品、待测样品或培养液对照（所加样品的量以加满孔为度），每种样品重复2～3孔。在培养板之上复以8μm孔径的硝酸纤维素膜。

3）盖上顶板并固定牢固。用0.2ml BSA-1640培养液洗涤各上层孔，洗去固定时可能滤入上孔的样品溶液。在顶板各孔中加50μl（2.5×10^5～5×10^5个）细胞悬液，置CO_2培养箱中培养3h，让细胞从膜的上面向下趋化运动。

4）如上小心取下膜，洗去膜上表面的细胞。将膜下表面（黏附着趋化的细胞）向上置玻璃板上，固定细胞。用苏木精染色细胞（参见本章第六节）。

5）在高倍显微镜下计数趋化的细胞。以对照孔每视野10个左右细胞的深度，计数5个视野的全部细胞。取3个重复孔细胞的平均值。结果以％表示：趋化细胞百分率（％）＝试验孔细胞数/对照孔细胞数×100。

注意事项

1）放置滤膜时，小心地让膜与样品溶液接触，不能有气泡，也不能让各孔中的液体相混。框架可以防止取培养板时滤膜移动。

2）培养时培养液中不加血清是为了防止血清中可能存在的趋化活性。培养时间因细胞种类而不同，通常为1～6h，应预先测定。

3）滤膜上表面的未迁移的细胞要尽量擦净，固定和卸下装置时，要防止滤膜皱褶。

4）如要了解趋化活性的特异性，可用不同趋化因子（IL-8、IL-16、PANTES、MCP或MIP）的中和抗体作为中和实验对照。中和抗体的量需要预先测定：将适量中和抗体与细胞因子样品一起加入底板各孔中，37℃结合15min。然后盖上顶板，加入细胞。如上进行趋化实验、固定染色和计数细胞，比较中和抗体对照与试验孔的结果即可区分不同趋化因子的作用。

（七）用β-葡萄糖醛酸或过氧化物酶检测趋化因子活性

趋化因子诱导中性粒细胞趋化时，细胞表达β-葡萄糖醛酸或过氧化物酶增加，表达量与趋化因子的浓度成正比，可间接了解趋化因子的含量。本方法可不用趋化装置，简便易行，但一些能诱导中性粒细胞表达β-葡萄糖醛酸或过氧化物酶的因素可引起假阳性结果。

材料与试剂

稀释液：含5μg/ml细胞松弛素B的PBS

反应液A：用0.1mol/L pH4.0乙酸钠缓冲液配制0.01mol/L *p*-硝基苯酚-α-D-葡萄糖苷酸

终止液：0.1mol/L pH10的甘氨酸/甘氨酸钠缓冲液

溶解液：0.2%Triton X-100，蒸馏水配制

反应液B：0.34mmol/L邻联茴香胺，0.02%（体积比）H_2O_2，0.05mol/L Na_2HPO_4，0.05mol/L pH5.0的枸橼酸钠缓冲液

96孔细胞培养板

酶联检测仪

37℃，5% CO_2的饱和水汽CO_2培养箱

步骤

1）如本节上述方法分离中性粒细胞，用稀释液将细胞配成1×10^7个/ml。

2）取96孔细胞培养板，每孔加0.1ml细胞悬液。

3）用稀释液系列稀释待测样品和趋化因子标准品（如IL-8），每孔加0.1ml稀释样品，每个稀释度3个复孔，对照孔只加稀释液。CO_2培养箱孵育30min。

4）取上清检测β-葡萄糖醛酸活性，细胞用于检测过氧化物酶活性。

5a）检测β-葡萄糖醛酸活性。取0.1ml培养上清到另一96孔细胞培养板的对应孔中，加入0.1ml反应液A。20℃孵育过夜。加入0.02ml终止液。在405nm处测定光密度（OD）值。以OD值对稀释度作图，根据标准品的标准曲线确定待测样品中IL-8的含量。

5b）检测过氧化物酶活性。吸去培养孔中的培养液。每孔加40μl溶解液，室温溶解细胞5min。每孔加新鲜配制的160μl反应液B，室温中振荡10min。在

405nm 波长处测定各孔中的 OD 值。以 OD 值对稀释度作图，根据标准品的标准曲线确定待测样品中 IL-8 的含量。

注意事项

两种酶活性可以同时检测，相互对照，使结果更准确。

二、趋化因子蛋白质的检测

检测和研究各种趋化因子及其受体蛋白的存在和含量的方法很多，最常用的是酶联免疫吸附试验（ELISA）。用 ELISA 检测蛋白质的详细操作步骤参见第十四章，用该法检测各种趋化因子时略有不同的是：用抗某种趋化因子特异性抗体（如抗 IL-8 单抗）包被检测板，加入待测样本后，用另一种抗该种趋化因子特异性抗体（如兔抗 IL-8 多抗）结合被包被抗体固定在板上的该种趋化因子，最后加酶标二抗（如羊抗兔 Ig）和底物显色。

在第十四章还介绍了检测分泌细胞因子的细胞的 ELISPOT 实验。其原理是用一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子某一表位的小鼠来源的单克隆抗体）包被 96 孔板。加入经不同处理的细胞培养，让细胞产生细胞因子。产生的细胞因子立即被包被的抗体吸附在板上。洗去细胞后用另一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子另一表位的兔抗细胞因子多克隆抗体）结合已吸附在板上的细胞因子。最后加入酶标记的羊抗兔 IgG 抗体和底物显色。用可溶性底物显色，可根据颜色的深浅了解产生细胞因子的细胞数量；如果用不溶性底物显色，则可根据形成的斑点，直接计数产生细胞因子的细胞。

另外，用放射免疫技术或发光免疫技术检测各种液相中的细胞因子或可溶性受体的含量（参见第十三章至第十五章），用流式细胞仪检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十五章），用 Western 印迹方法检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十二章），用免疫组织化学方法定位研究细胞因子或其受体在组织中的分布（参见第二十七章）。

三、趋化因子 mRNA 的检测

RT-PCR 和定量 RT-PCR 技术检测各种细胞表达趋化因子或其受体 mRNA 的详细操作步骤参见第十七章。

第六节　集落刺激因子

集落刺激因子（colony-stimulating factor，CSF）是一类能诱导人（或小鼠）骨髓细胞或造血细胞在半固体琼脂系统中呈克隆生长并形成集落的细胞因子，属于造血生长因子。不同的 CSF 诱导造血系统的不同细胞呈克隆生长：多功能集落刺激因子（multi-CSF）或白细胞介素 3（interleukin-3，IL-3）刺激粒细胞、巨噬细胞、巨核细胞和红细胞的集落形成，粒细胞集落刺激因子（granulocyte CSF，G-CSF）刺激粒细胞集落形成，粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage CSF，GM-CSF）刺激粒

细胞和巨噬细胞集落形成，巨噬细胞集落刺激因子（macrophage CSF，M-CSF）刺激巨噬细胞集落形成，红细胞生成素（erythropoietin，EPO）刺激红细胞集落形成，血小板生成素（thrombopoietin，TPO）诱导巨核细胞集落形成等。另一些细胞因子［如干细胞因子（stem cell factor，SCF)］也是造血生长因子。许多其他细胞因子也有诱导造血细胞分化生长的作用。

CSF 与骨髓造血以及骨髓细胞的定向分化密切相关。因此研究 CSF 不但可以更深入地了解机体的生理和病理过程，还可以开发 CSF 治疗疾病，检测不同的 CSF 对某些疾病的诊断和分型也有重要意义。

检测 CSF 的体外方法主要有两类：集落形成试验和依赖因子的细胞株生长试验。用骨髓干细胞在软琼脂中的集落形成试验检测 CSF 的活性是最早建立的检测方法。但集落形成实验需时长（7～14d），特异性较差，集落的大小和数量易受样品中其他因子的影响。用依赖细胞株的生长实验（参见本章第二节）简便、快速、敏感性也较高，对定量和定性检测 CSF 特别有用，亦可研究 CSF 维持造血细胞成活、刺激细胞增殖、诱导细胞分化成熟和促进细胞功能等活性，所以应用较广泛。但不同细胞株往往对多种细胞因子有增殖反应，此一缺点可用特异性中和抗体加以克服。表 9-4 列举了可用于检测 CSF 的 CSF 依赖细胞株。

表 9-4 可用于检测 CSF 的 CSF 依赖细胞株

细胞株	细胞因子	细胞株	细胞因子	细胞株	细胞因子
FDCP-1	IL-3，GM-CSF	FA3.15	GM-CSF	BAC1.2F5	M-CSF，GM-CSF
FDCP-2	IL-3，SCF	DA1	GM-CSF，SCF	J774	M-CSF
32DCL23	IL-3，G-CSF	NFS-60	GM-CSF	32DE	EPO
M1	G-CSF	MO-7E	SCF	EPFDC-P2	EPO

以下以 SCF 诱导 MC/9 细胞增殖试验为例介绍。

一、SCF 诱导 MC/9 细胞增殖试验

MC/9 是小鼠肥大细胞株。在本试验中，5ng/ml 小鼠 SCF 可诱导 50％最大 MC/9 细胞增殖。但 MC/9 细胞对人 SCF 的敏感性是小鼠 SCF 的敏感性的 1/800，即诱导 50％最大增殖的剂量是 4g/ml。

SCF 诱导 50％ MO-7E 细胞增殖的剂量是 10ng/ml，检测范围为 1～100ng/ml。但 MO-7E 细胞增殖试验特异性较差，需用抗体做中和试验以确定特异性。

材料与试剂

含10％ 小牛血清的完全 DMEM 培养液（10-DMEM 培养液）

SCF 标准品

96 孔细胞培养板

37℃，5％ CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）在检测前 24h 更换细胞培养液，洗涤去除全部可能存在的细胞因子。用 10-DMEM 培养液配制 5×10^4 个/ml 细胞悬液。

2）取 96 孔细胞培养板，每孔加 0.1ml 细胞悬液（5000 个细胞），0.1ml 系列稀释的 SCF 待测样品或标准品。在 CO_2 培养箱中培养 48h。

3）用 ^{3}HTdR 摄入法或 MTT 检测法测定增殖的细胞数，以能诱导半数最大增殖的 SCF 量为 1 个单位。

二、集落形成试验

在集落形成试验中，骨髓前体细胞或集落形成细胞（colony-forming cell，CFC）的生长绝对依赖于 CSF 的连续存在。在 CSF 的作用下，每个前体细胞增殖成为一个造血细胞集落，细胞集落数和每个集落中的平均细胞数与 CSF 的浓度成正比。与依赖细胞株生长试验相比，集落形成试验有以下优点：①用于集落形成试验的是新鲜分离的骨髓造血细胞，也是 CSF 在生理状态下作用的靶细胞，因此试验更接近生理状态；②由于骨髓造血细胞包括多种细胞前体，因此实验可以研究 CSF 对不同前体细胞亚群的作用；③试验还可研究集落中的成熟细胞，了解 CSF 对集落形成细胞分化方向和分化阶段的影响；④如果纯化集落形成细胞并使用无血清培养基，就可以区分 CSF 对集落形成细胞的直接作用或间接作用，进而研究 CSF 调节细胞增殖和分化时的相互作用。

不同 CSF 可诱导不同的骨髓前体细胞形成不同的细胞集落。这些可形成集落的前体细胞有不同的命名，因此集落形成试验也相应地有不同的命名：混合集落形成细胞（Mix-CFC）试验指前体细胞中 CSF 的作用下可形成多种细胞集落，早期红细胞前体（BFU-E）、较晚期红细胞前体（CFU-E）、中性粒细胞集落形成细胞（G-CFC）、巨噬细胞集落形成细胞（M-CFC）、中性粒细胞-巨噬细胞集落形成细胞（GM-CFC）、嗜酸粒细胞集落形成细胞（Eo-CFC）或巨核细胞集落形成细胞（Meg-CFC）等试验分别有相应的 CSF 刺激各自的集落形成细胞集落。

集落形成实验是将集落形成细胞均匀分散在营养软琼脂糖中，集落形成细胞能够在 CSF 的作用下分化和分裂繁殖，但相比不会移动，形成完整的集落。集落的数量和大小（即形成集落的细胞数）与营养软琼脂糖中的 CSF 含量成正比。因此，在集落形成试验中，集落形成细胞的细胞数应当适宜，避免形成的集落相互重叠。也可将琼脂糖培养物干燥和染色后永久保存，镜检染色培养物中的细胞可确定形成集落的细胞类型。

（一）小鼠骨髓细胞的集落形成试验

此试验中形成的细胞集落包括各种髓样细胞集落（中性粒细胞、嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞、红细胞、单核巨噬细胞和巨核细胞），所以称为混合集落形成细胞（mix-CFC）试验。试验完成后，可直接计数细胞集落，再用吸管吸出各个集落做细胞学检验。也可干燥培养物和染色后永久保存。

材料与试剂

6.6%琼脂糖（双蒸水配制）

IMDM 培养液

2×IMDM 培养液（用 IMDM 粉剂配制 2 倍浓缩的培养液）

10%牛血清白蛋白（BSA）

CSF 标准品

胎牛血清

10U/ml 促红素（EPO）

5ml 试管

45℃水浴箱和 37℃水浴箱

36℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）按第二章的方法分离小鼠骨髓细胞，用 IMDM 培养液配成 1.7×10^5 个/ml。

2）加热溶化 6.6%琼脂糖，置 45℃水浴中保温。加入预温的 2×IMDM 培养液，充分混匀。

3）取一系列试管，每管依次加入：0.3ml 小鼠骨髓细胞，0.3ml 10% BSA，0.3ml 系列稀释的待测样品或 CSF 标准品，0.6ml 胎牛血清，0.06ml EPO 和 1.5ml IMDM 培养液（总量约为 3ml），充分混匀，置 37℃预温。

4）每只试管中加 0.3ml 琼脂糖培养液，小心但充分地混匀后将混合液分到 3 个 3cm 直径的培养皿中，每皿 1ml。此过程要快，以防琼脂凝固，但一定要充分混匀。

5）在室温中或冰箱中凝固琼脂糖。置 36℃，5%CO_2 培养箱中培养 10d。

6）用倒置显微镜计数细胞集落。并可进一步用吸管吸出各个集落做细胞学检验。

7）结果的表示方法有几种：①用样本稀释度对集落数目作图，绘制标准品的剂量-反应标准曲线，待测样品的集落形成数目与标准曲线比较，即可得到待测样品中 CSF 的含量；②集落刺激活性（CSA）=集落形成数目/10^5 个骨髓细胞；③将50%最多集落形成数目时 CSF 的最大稀释度定为 50U；④或一个集落代表 1 个单位。

注意事项

1）试验中，如不需要检测红细胞集落可不加 EPO。GM-CFC、G-CFC 和 M-CFC 的生长并不一定需要 BSA，可以不加。CFU-E 是对 EPO 十分敏感的、较成熟的幼红细胞，其集落出现较早（约 2d 时出现，以后渐消失），常用于研究 EPO 的活性。而 BFU-E 则是更早期的前红细胞，它需经 IL-3 或 GM-CSF 刺激增殖后才能对 EPO 反应。G-CFC 集落在培养 7d 时计数较好。

2）45℃的琼脂糖溶液与 37℃的细胞悬液混合后，要尽快充分混合均匀并尽快倒入培养皿。否则容易出现琼脂糖凝块。可用低熔点琼脂糖代替普通琼脂糖，不易形成琼脂糖凝块。

3）铺平皿时如细胞过浓或红细胞太多，可能出现凝集细胞团，需用吸管小心吸去这些细胞团，以免影响结果。

4）在培养中温度和湿度很重要，温度即使比37℃升高0.1℃对骨髓细胞生长也是有害的，但稍低的温度对骨髓细胞生长影响不大，大多数CO_2培养箱的温度调节范围是±0.5℃，所以培养骨髓细胞时用36℃或36.5℃。为防止琼脂糖干燥，湿度必须饱和，开门过多和气体流率过大都会使琼脂变干，不利骨髓细胞生长，可将培养物放在湿盒中培养。较低的O_2浓度百分率有利于某些骨髓细胞形成集落，所以CO_2培养箱的气体是含5% CO_2的空气或含5% CO_2和5% O_2的氮气。

5）培养皿四周的琼脂糖较厚，形成的细胞集落可能变形，计数集落时应注意辨认。琼脂糖培养物中可能会出现许多巨噬细胞，在培养时加1或2滴10%墨汁，巨噬细胞吞噬墨汁后呈黑色，容易辨认。

6）集落形成不良可能与培养液、BSA、血清以及培养条件有关。培养液需新鲜配制，在4℃保存不超过两周，毫克分子渗透压浓度（osmolarity）应为280～300（小鼠细胞）mOsm/L或300（人细胞）mOsm/L。血清和BSA需要预先检测是否合适骨髓细胞集落生长，BSA还需经去离子处理，合适的血清和BSA在－20℃可保存一年，应分装冻存以避免反复冻溶。有用无血清培养液代替BSA、血清和IMDM培养液，避免了诸多干扰，其结果也令人满意。

7）如果需要在集落形成试验后分离细胞做染色体分析，用琼脂糖做介质不易得到理想结果。可用甲基纤维素代替：用IMDM培养液配制1.6%～2.7%甲基纤维素（调整甲基纤维素的浓度使黏度为4000MPa·s），在步骤2）时，以1∶1的比例将预温的甲基纤维素溶液与试管中的细胞混合物均匀混合后铺平皿。培养条件相同。

附：琼脂糖培养物的保存

琼脂糖培养物经干燥和染色后可以永久保存。镜检染色琼脂糖糖培养物中的细胞可确定形成集落的细胞类型。

材料与试剂

Hank's液

3%戊二醛（Hank's液含1%盐酸的乙醇配制）

苏木精染液

含1%盐酸的乙醇

0.5%伊红染液（蒸馏水配制）

步骤

1）在集落形成试验完成后向琼脂糖培养物中加2ml Hank's液，轻轻洗去表层散在的琼脂糖，再加2ml Hank's液，用针头沿培养皿四周壁插入轻轻拨动琼脂糖使琼脂糖与培养皿分离。

2）吸去Hank's液，加1.5ml 3%戊二醛固定10min。

3）吸去戊二醛溶液，向培养皿中加蒸馏水，再将培养皿放在水盆中使琼脂糖漂浮，用玻片将琼脂糖平展地托起。

4）用滤纸小心吸干水分。自然干燥玻片上的琼脂糖或37℃烘干。

5）晾干琼脂糖膜后，立即用苏木精染液染色10～15min，水洗后用含1%盐酸的乙醇浸泡到细胞核呈紫红色。

6）用水冲洗30min，用0.5%伊红染液染色4～5min。

7）水洗后经75%、80%、90%和100%乙醇依次脱水，二甲苯中浸泡2次，每次5min。最后盖上盖玻片，用树脂胶封固。

注意事项

1）苏木精染液（Mayer's hematoxylin）染液：将1g苏木精溶于1000ml热蒸馏水中，加50g钾明矾和0.2g碘酸钠搅至全溶，再加50g水合氯醛和1g枸橼酸，加热至沸腾5min，冷后过滤，次日可用。

2）固定后的琼脂糖较脆，应小心操作。琼脂糖平展地铺在玻片上后，要用滤纸尽量吸干水分，使琼脂糖与玻片牢固相黏附，以防干燥时回缩。

（二）人骨髓细胞或外周血细胞的集落形成试验

人的骨髓细胞较难得到，可以用外周血细胞代替。因为PBMC中也有一定量的集落形成细胞，只是需要较多的细胞。人骨髓细胞或外周血细胞的集落形成试验与小鼠骨髓细胞的集落形成试验过程基本相同，但人CFU-E需培养7d，人GM-CFC需培养9～14d，人BFU-E和Mix-CFC则需培养14d。

以下以IL-5诱导骨髓嗜酸粒细胞集落形成为例介绍人骨髓集落形成试验。

材料与试剂

含20%胎牛血清的IMDM培养液（20-IMDM培养液）

5%集落培养琼脂糖（如Difco Bacto-agar，20-IMDM培养液配制）

IL-5标准品

染液A：1% Luxol-Fast-Blue，用尿素饱和的70%乙醇（每升70%乙醇中约加250g尿素）配制。此液可重复使用

染液B（Harris苏木精染液）：取1g苏木精（hematoxylin）在50ml乙醇中稍加热溶解。将此液加入1L 10%（质量体积比）硫酸铝氨水溶液中，迅速置沸水中。小心加入2.5g氧化汞，冷却后滤过。每100ml染液加4ml乙酸。此液可重复使用

甲醇

30mm直径的平皿

垫有湿滤纸的保湿盒

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）人骨髓细胞的制备：外科方式无菌抽取骨髓，用IMDM培养液将细胞配成

$1\times10^7\sim2\times10^7$ 个/ml。按第一章分离 PBMC 的方法用淋巴细胞分离液分离骨髓细胞。

2）用 IMDM 培养液洗涤细胞 2 次，每次 500g 离心 10min。用 20-IMDM 培养液将骨髓细胞配成 2×10^5 个/ml，置 37℃保温。

3）配制 5%集落培养琼脂糖，加热溶解后 45℃保温。

4）将 1 份琼脂糖和 15 份骨髓细胞悬液充分混合，每 0.4ml 混合物（约含 8×10^4 个骨髓细胞）中加 0.1ml 系列稀释的 IL-5 待测样品或标准品（37℃预温），充分混匀。

5）取 30mm 直径的平皿，每皿加 0.5ml 上述混合物，均匀铺开。

6）将平皿置于垫有湿滤纸的保湿盒中让琼脂糖凝固。在 CO_2 培养箱中培养 14～21d。

7）加少许 PBS 于孔中，从边缘小心分离碟形的琼脂糖培养物，并将其转移到玻片上。在碟形的琼脂糖培养物上覆盖滤纸，置于温暖干燥处晾干。

8）在碟形的琼脂糖培养物尚未完全晾干时取去滤纸，继续晾至完全干燥，注意勿使琼脂糖培养物皱缩。在甲醇中固定 15min。

9）在染液 A 中浸染干燥的琼脂糖培养物 1.5h，在自来水下小心冲洗 3min，洗去染液 A。

10）在染液 B 中浸染 2min，在自来水下小心冲洗 3min，洗去染液 B。

11）在显微镜下计数嗜酸性粒细胞集落数（细胞核呈蓝色，嗜酸性颗粒呈绿色）和其他集落的细胞数。

注意事项

最后染色的琼脂糖培养物可如前脱水固定后长期保存。

（三）检测 EPO 的 CFU-E 集落试验

材料与试剂

含 20%胎牛血清的 IMDM 培养液（20-IMDM 培养液）

0.1ml 枸橼酸化的牛血浆

1%联苯胺（用 95% 乙醇配制，4℃避光可保存 4 周）

苏木精（benzidine-hematoxylin）染料

1%盐酸的乙醇

35mm 直径的培养皿

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）按第二章的方法制备小鼠骨髓细胞并用 20-IMDM 培养液将细胞配成 5×10^5 个/ml。

2）制备血浆凝集培养系统（plasma clot culture system）：0.8ml 用 20-IMDM 培养液系列稀释的 EPO 标准品（从 5U 稀释到 500mU，共 5～10 个稀释度）或待测样品，0.1ml 枸橼酸化的牛血浆和 0.1ml 骨髓细胞悬液，混匀。

3）每个 35mm 直径的培养皿中加 1ml 上述混合液。在 CO_2 培养箱中培养 48h。

4）计数红细胞集落：红细胞集落呈暗黄色或橘黄色，集落内细胞较小，不染色也可清楚地分辨。

5）根据标准品的标准曲线定量待测样品中的 EPO。

注意事项

联苯胺-苏木精染色的是红细胞内血红素，因此更容易鉴定红细胞集落，红系细胞质呈橘黄色，细胞核呈蓝紫色。染色方法是：自然干燥培养物或吸出的细胞（置玻片上），加 1%联苯胺染色 3min，加 3% H_2O_2 作用 1min，双蒸水冲洗，用苏木精染液染色 6min，含 1%盐酸的乙醇脱色 5s，水洗，干燥封片保存。

（四）检测 SCF 的集落形成试验

检测 SCF 的集落形成试验称为高增殖活力集落形成细胞（high proliferative potential colony-forming cell）试验，此试验用 5-氟尿嘧啶（5-FU）处理小鼠 2d，使小鼠骨髓细胞对 IL-3、GM-CSF 和 G-CSF 都不反应（不能形成集落）。用这种骨髓细胞检测人或鼠 SCF，特异性较好。

材料与试剂

5-FU

低熔点琼脂糖

含 20%胎牛血清的完全 McCoy 培养液（20-McCoy 培养液）

37℃，5% CO_2 的饱和水汽 CO_2 培养箱

步骤

1）取 BALB/c（或 C57BL/6J）小鼠，尾静脉注射 5-FU（150mg/kg）。

2）2d 后取股骨，分离骨髓细胞（参见第二章）。用 20-McCoy 培养液将骨髓细胞配成 4×10^5 个/ml。置 37℃预温。

3）用 20-McCoy 培养液配制 0.6%的低熔点琼脂糖，置 40℃保温。迅速将 0.5ml 细胞悬液与 0.5ml 琼脂糖溶液彻底混合均匀，立即注入 6 孔细胞培养板的孔中，固化后，置 CO_2 培养箱中培养 2 周。

4）在显微镜下计数大于 1mm 的集落数目。SCF 的活性以集落形成活性（集落数目/10^5 个细胞）表示。

注意事项

1）完全 McCoy 培养液：含 0.1mg/ml 丙酮酸钠，0.24ml 必需氨基酸，0.24ml 非必需氨基酸，0.027% $NaHCO_3$，0.24ml 混合维生素溶液，0.72mmol/L 谷氨酰胺，25μg/ml L-丝氨酸，12μg/ml L-天冬氨酸的 McCoy 培养液。

2）其余同小鼠骨髓细胞的集落形成试验。

三、CSF 蛋白质的检测

检测和研究各种 CSF 及其受体蛋白的存在和含量的方法很多，最常用的是酶联免疫吸附实验（ELISA）。用 ELISA 检测蛋白质的详细操作步骤参见第十四章，用该法检

测各种 CSF 时略有不同的是：用抗某种 CSF 特异性抗体（如抗 GM-CSF 单抗）包被检测板，加入待测样本后，用另一种抗该种 CSF 特异性抗体（如兔抗 GM-CSF 多抗）结合被包被抗体固定在板上的该种 CSF，最后加酶标二抗（如羊抗兔 Ig）和底物显色。

在第十四章还介绍了检测分泌细胞因子的细胞的 ELISPOT 实验。其原理是用一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子某一表位的小鼠来源的单克隆抗体）包被 96 孔板。加入经不同处理的细胞培养，让细胞产生细胞因子。产生的细胞因子立即被包被的抗体吸附在板上。洗去细胞后用另一种抗细胞因子抗体（如抗细胞因子另一表位的兔抗细胞因子多克隆抗体）结合已吸附在板上的细胞因子。最后加入酶标记的羊抗兔 IgG 抗体和底物显色。用可溶性底物显色，可根据颜色的深浅了解产生细胞因子的细胞数量；如果用不溶性底物显色，则可根据形成的斑点，直接计数产生细胞因子的细胞。

另外，用放射免疫技术或发光免疫技术检测各种液相中的细胞因子或可溶性受体的含量（参见第十三章至第十五章），用流式细胞仪检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十五章），用 Western 印迹检测各种细胞表达细胞因子或其受体的情况（参见第二十二章），用免疫组化方法定位研究细胞因子或其受体在组织中的分布（参见第二十七章）。

四、CSF mRNA 的检测

RT-PCR 和定量 RT-PCR 技术检测各种细胞表达 CSF 或其受体 mRNA 的详细操作步骤，参见第十七章。

第七节　细胞表面和细胞内细胞因子检测技术

一些细胞因子（如 TNF-α）可以在细胞表面表达一段时间然后释放到体液后培养液中。因此，检测细胞表面的细胞因子可以鉴定产生细胞因子的细胞，了解不同生理和疾病状态时或不同条件处理时，细胞因子产生细胞的量的变化以及其表达细胞因子的能力的变化。由于膜型细胞因子只在细胞表面短暂表达，所以检测膜型细胞因子时应选择适当的时机。如果细胞因子是在一定时间内分泌的，检测膜型细胞因子应早于这一时间或者在这一时间的早期检测，如果细胞因子是连续分泌且有一定的分泌量的变化，膜型细胞因子的变化通常早于分泌量的变化。检测膜型细胞因子的方法主要有流式细胞仪检测、免疫荧光检测和免疫组织化学原位检测等。

细胞因子是在细胞内合成后才分泌出来。利用这一点，可以检测分泌细胞因子的细胞，了解产生细胞因子的细胞类型及其数量和功能。例如，检测细胞内 IL-17 可以了解 Th17 细胞的数量和分选 Th17 细胞。检测细胞内 IFN-γ 和 IL-4 也是区分和鉴定 Th1 和 Th2 细胞的方法之一。

一、细胞表面细胞因子的分析

（一）用流式细胞仪技术分析细胞表面细胞因子

利用荧光标记的抗膜型细胞因子单克隆抗体的免疫荧光技术，通过荧光激活细胞分选技术（fluorescence-activated cell sorting，FACS），对膜表面结合有膜型细胞因子的细胞进行定性或定量分析与分离。本实验方法操作简便、快速、直观、灵敏度较高。

材料与试剂

结合有膜型细胞因子的待检细胞悬液

PBS

消化液

含 2%人血清、0.1%叠氮化钠的 PBS

羊或兔抗膜型细胞因子的多克隆抗体（polyclonal antibody，PcAb）

荧光素标记的抗膜型细胞因子单抗

荧光素标记的兔（或羊）抗羊（或兔）IgG

圆底 96 孔细胞培养板，细胞培养板离心机，温浴箱，刻度吸管，毛细吸管，加样器，37℃5%CO_2 培养箱，流式细胞液，细胞计数板，流式细胞仪

步骤

1）将结合有膜型细胞因子的待检细胞加或不加激活剂，CO_2 培养箱中培养一定时间。

2）用消化液消化结合有膜型细胞因子的待检细胞悬液，2000r/min 离心 10min，弃上清。

3）用含 2%人血清、0.1%叠氮化钠的 PBS 重悬细胞至 1×10^6 个/ml。

4）将细胞悬液加入圆底 96 孔细胞培养板中，100μl/孔（1×10^5 个细胞/孔）。

5）每孔加适量荧光素标记的抗膜型细胞因子单抗，置于冰上 20min。

6）用 PBS 洗板 4 次后，用流式细胞仪分析荧光阳性细胞（即膜表面结合模型细胞因子的阳性细胞）的百分率及平均荧光强度，并可进行分离。

上述介绍的为直接法，要求具备荧光素标记的抗膜型细胞因子单抗，如无则可采用间接法，基本步骤如下。

1）～4）步同上。

5）加入 1∶500 稀释度的羊（或兔）抗膜型细胞因子 PcAb，置于冰上 20min。

6）用 PBS 在细胞培养板离心机中离心洗板 1 次，去除未结合的抗体。

7）再加入 1∶500 稀释度的荧光素标记的兔（或羊）抗羊（或兔）IgG，置于冰上 20min。

8）用 PBS 在细胞培养板离心机中离心洗板 4 次后，用流式细胞仪分析荧光阳性细胞（即膜表面结合模型细胞因子的阳性细胞）的百分率及平均荧光强度，并可进行分选分离。

注意事项

1）流式细胞仪为高精度大型仪器设备，不同厂家的分析软件有所不同，使用人员需经过专门培训。

2）在流式细胞仪分析前，样品宜先经过 35μm 口径的尼龙筛过滤或较强力混悬，以免细胞团块影响分析和堵塞流式细胞仪。

3）荧光抗体的用量应预先确定或根据厂家说明书稀释，常用终浓度为 1∶500。

4）荧光抗体标记细胞时应避光，标记完毕后可置 4℃冰箱中。

5）每步之间要用 PBS 充分洗涤。

6）必须设立无关抗体的阴性对照，其亚类要与试验抗体相同。

（二）细胞 ELISA 法检测表达膜型细胞因子的细胞

将细胞固定中酶标板上，用正常羊（或兔）血清封闭细胞表面的、可与酶标抗体结合的位点（如 Fc 受体），再用酶标记的羊（或兔）抗细胞因子抗体结合膜表面的细胞因子，最后加入底物显色，测定的 OD 值的大小与膜型细胞因子的量成正比。可用细胞因子标准品以常规 ELISA 方法检测，绘制标准曲线，从标准曲线中可查得待测细胞样品中表面细胞因子的含量。

本法有直接法和间接法，上述为直接法。间接法通常用小鼠抗细胞因子抗体结合膜表面的细胞因子，再加酶标记的羊（或兔）抗小鼠 IgG 抗体，最后加入底物显色。直接法简单，虽然敏感性较低，本底也很低，但酶标记抗细胞因子抗体价格较贵。间接法敏感性较高，应注意设立对照，防止假阳性。

本法只能了解膜型细胞因子的量，不能判定表达膜型细胞因子的细胞的量。用下述的间接免疫荧光法可以定量表达膜型细胞因子的细胞。

材料与试剂

待测细胞悬液（细胞浓度为 1×10^6 个/ml）

1%多聚甲醛

10%的正常羊（或兔）血清

PBS

含 3%牛血清白蛋白的 PBS（3%BSA-PBS）

辣根过氧化物酶标记的羊（或兔）抗膜型细胞因子抗体

底物缓冲液：溶液 A：双蒸水配制 0.1mol/L Na_2HPO_4，4℃或－20℃保存。溶液 B：21.0g 枸橼酸，1.2g 邻苯二胺（orthophenylenediamine，OPD），溶于 1000ml 双蒸水中，－20℃避光保存。应用液（用前新鲜配制）：取 2 份溶液 A，1 份溶液 B 混匀（此时 pH 为 5.0），加入 10μl/ml 3% H_2O_2（终浓度 0.03%），立即应用

96 孔聚苯乙烯板（微量板）

微量板离心机，37℃，5% CO_2 培养箱，吸管，加样器

步骤

1）将经不同处理的待测细胞悬液加入微量板各孔中，0.1ml/孔，10^5～10^6 细胞。

2）用微量板离心机，2000r/min 离心细胞 5min。小心吸去上清。

3）每孔加 0.1ml 1%多聚甲醛，室温放置 20min，固定细胞于 PVC 板中。

4）每孔加 0.1ml PBS，2000r/min 离心微量板 5min，去上清，洗去多聚甲醛。

5）每孔加 0.1ml 含 3%BSA-PBS，37℃孵育 1h，封闭抗体非特异性结合位点。

6）弃上清，每孔加入 1∶50 稀释的酶标羊（或兔）抗膜型细胞因子抗体。以正常羊（或兔）血清作为阴性对照，CO_2 培养箱中孵育 1～2h。

7）每孔加 0.1ml PBS，2000r/min 离心微量板 5min，去上清，洗涤细胞 3 次。

8）显色：各孔加 0.1ml 新鲜配制的底物缓冲液，置室温或 37℃下避光反应 15～30min。

9）用酶标仪，490nm 处测定 OD 值。直接比较不同处理细胞表达膜型细胞因子的量。如果要定量膜型细胞因子，可同时用常规 ELISA 方法（见第十四章）检测系列稀释的细胞因子标准品并绘制标准曲线，从标准曲线中即可求得待测细胞膜型细胞因子含量。

注意事项

1）接种细胞的活力应大于 95%。接种的细胞数根据不同的细胞而定，需做预实验。

2）向板中加试剂和洗涤细胞吸去上清时，要尽量小心，以免丢失细胞。

3）如果用含 3%BSA-PBS 封闭抗体非特异性结合位点的效果不理想，可改用 10%的正常羊（或兔）血清封闭。血清中的抗体可封闭细胞表面的 Fc 受体。

4）酶标抗体与细胞的孵育时间根据不同的细胞而定，通常为 37℃ 1～2h，必要时可 4℃过夜以增加敏感性。

（三）间接免疫荧光法检测表达膜型细胞因子的细胞

利用抗膜型细胞因子单抗（一抗）与细胞表面的膜型细胞因子结合，再选用荧光素标记的（羊或兔）抗小鼠 IgG（二抗）与一抗特异性结合，即可借助荧光显微镜直接计数细胞群体中阳性细胞的比例。本试验方法具有特异、灵敏、省时和操作简便等优点。

材料与试剂

一抗：任意一株抗待测细胞膜型细胞因子的单抗

二抗：荧光素标记的羊（或兔）抗小鼠 IgG，使用时做适当稀释，稀释液为含 1% BSA 的 PBS

待测细胞：用含 5%FCS 的 Hank's 液调浓度为 1×10^7 个/ml，细胞存活率应大于 95%

人 Ig（封闭非特异性结合位点）

含 5%胎牛血清（FCS）的 Hank's 液

含 1%BSA 的 PBS

1%多聚甲醛

小试管（10mm×75mm），刻度吸管，毛细吸管，加样器，细胞计数板，荧光显微镜，4℃冰箱、载玻片，盖玻片和离心机

步骤

1）将待测细胞［如植物凝集素（PHA）刺激的 PBMC］加入小试管中，100μl/管，即 1×10^6 个/管。
2）向试管内加入人 Ig，100μl/管，孵育 15min 以除去抗体的 Fc 段非特异性结合。
3）加入抗待测细胞膜型细胞因子的单抗，100μg/100μl/管，4℃孵育 30～60min。
4）加入 2ml 冷的含 5%FCS 的 Hank's 液，洗涤 2～3 次，1500r/min 离心 5min。
5）加入适量稀释的荧光素标记的羊（或兔）抗小鼠 IgG，100μl/管，4℃孵育 30min。
6）加入 2ml 冷的含 5%FCS 的 Hank's 液，洗涤 2～3 次，1500r/min 离心 5min。
7）用 1%多聚甲醛固定细胞后，用毛细吸管吸取固定后的细胞滴加于载玻片上，用荧光显微镜计数荧光阳性细胞，计数荧光阳性细胞百分比。

注意事项

1）用荧光显微镜使用高倍镜计数，先在普通光源下计数视野中淋巴细胞总数，每份标本应至少计数 200 个淋巴细胞，然后再在荧光显微镜下计数荧光阳性细胞数，最后计算出阳性细胞百分率。荧光阳性细胞的特点是：在细胞膜上可见明亮的黄绿色斑点状或半月形荧光，有时也可见到整个细胞膜周围呈环状荧光。混杂的多形核细胞也可呈现片状或均匀的荧光染色，应在普通显微镜下加以区分和排除。
2）待测细胞活性应大于 95%。应去除样品中的红细胞，以免影响结果。

（四）间接放射免疫法检测表达膜型细胞因子的细胞

选用两种抗体，一抗为抗膜型细胞因子抗体，可与细胞膜表面的细胞因子特异性结合；二抗为标记放射性核素 ^{125}I 的抗一抗抗体，可与一抗特异性结合，通过测定其放射量，并与标准品对照，即可间接测定细胞膜表面的细胞因子。

本试验方法常用于各种激素、微量白蛋白、肿瘤标记物和药物等微量物质的检测，也可用于膜型细胞因子的检测。它既具有免疫反应的高特异性，又具有放射性测量的高灵敏度，因此能精确测定各种具有免疫活性的极微量的物质。

本试验方法灵敏度高、特异性强、应用范围广及操作简便等优点。但也具有如下缺点：只能以免疫反应测得具有免疫活性的物质，无法测出具有生物活性但失去免疫活性的物质；由于使用了生物试剂，其稳定性受多种因素影响，需要有一整套质量控制措施来确保结果的可靠性；灵敏度受方法本身工作原理的限制，对体内某些含量特别低的物质尚不能测定；由于放射免疫分析是竞争性的反应，被测物和标准物都不能全部参与反应，测得的值是相对量而非绝对量；存在放射线辐射和污染等问题。

材料与试剂

1%多聚甲醛

PBS

含3%牛血清白蛋白的PBS（3%BSA-PBS）

一抗：羊（或兔）抗膜型细胞因子抗体

二抗：^{125}I标记的兔（或羊）抗羊（或兔）IgG

正常羊（或兔）血清

待测细胞悬液（细胞浓度为1×10^6个/ml）

96孔聚苯乙烯板（PVC板）

γ计数仪，96孔PVC酶联检测板，37℃水浴箱，刻度吸管，毛细吸管，加样器

步骤

1）将准备好的待测细胞悬液加入96孔PVC酶联检测板各孔中，0.1 ml/孔，再用1%多聚甲醛固定于PVC板中，然后用PBS洗去多余的多聚甲醛。

2）设立不同倍比稀释度的细胞因子标准品。

3）加入含3%BSA-PBS，每孔0.1ml，37℃水浴箱孵育1h，封闭抗体非特异性结合位点。

4）弃上清，每孔加入1∶50稀释度的羊（或兔）抗膜型细胞因子抗体。以正常羊（或兔）血清作为阴性对照，37℃孵育45min。

5）用PBS洗3次，去除未结合的一抗。

6）加入^{125}I标记的兔（或羊）抗羊（或兔）IgG，2000cpm/孔，37℃水浴箱孵育45min。

7）用PBS充分洗板后，用γ计数仪测量放射活性。

8）从标准曲线中即可求得待测细胞膜型细胞因子含量。

注意事项

1）由于存在放射线辐射和污染等可能性，操作时应注意保护自己和环境，放射性废弃物应按规定处理。

2）加入分离剂时，混匀静置时间可以延长，不能缩短。保证抗原-抗体复合物与第二抗体的充分结合。

3）试验时注意观察水浴箱的水温，误差不能太大，一般在±1℃之间。

二、细胞内细胞因子的分析

（一）流式细胞仪检测细胞内细胞因子

检测细胞内细胞因子需要先用皂角苷中细胞表面打孔（增加细胞膜通透性），让荧光素标记的特异性抗细胞因子抗体进入细胞结合细胞内的细胞因子，再用FACS从单细胞水平检测细胞内的细胞因子。结合其他针对细胞表面标志的荧光素标记抗体，还可判断产生特定细胞因子的细胞种类、细胞定位、分布密度及细胞因子与组织病变的关

系等。

本实验方法还能用于检测细胞内的各种抗原物质、分析淋巴细胞及其亚群、分类其他细胞、检测病毒抗原、诊断白血病和肿瘤等。本实验方法快速、简便、灵敏、高效、安全以及接近生物体的分析条件。现以 FACS 检测人 PMBC 内的细胞因子为例简单介绍。

材料与试剂

人PMBC（见第一章）

含 10%小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液（10-1640 培养液）

4%多聚甲醛，BSA，DMSO，脱脂奶粉

PBS

0.1%皂角苷-PBS（含 5%脱脂奶粉、1mmol/L Ca^{2+}、1mmol/L Mg^{2+}、0.1%皂角苷和 0.1%BSA 的 PBS）

用 0.1%皂角苷-PBS 稀释的 0.1mg/ml 不含特异性抗体的同种抗体

用 0.1%皂角苷-PBS 稀释的 0.1mg/ml 未标记的荧光素的抗细胞因子单抗

用 0.1%皂角苷-PBS 稀释的 100～1000 倍量细胞因子

荧光素标记的抗细胞因子单抗

细胞培养板，96 孔塑料软板或 V 形底离心管，CO_2 培养箱，混匀振荡器，离心机，流式细胞仪

步骤

1）按第一章介绍的方法分离 PBMC，用 10-1640 培养液调节细胞浓度为 2×10^6 个/ml。

2）取上述细胞悬液，加于 6 孔细胞培养板中，2ml/孔。用不同方法刺激细胞产生细胞因子［如 2μmol/L Monensin、1μmol/L Ionomycin 和（或）20ng/ml 佛波醇酯（phorbol 12-mynistate 13-acetate，PMA）］。

3）根据刺激方法的需要，在 CO_2 培养箱中培养适当时间。

4）将细胞转移到 15ml 离心管中。用 4℃ PBS 洗涤细胞 1 次，留下少许液体悬浮细胞，使细胞完全分散于离心管中。

5）于每管中加入 3ml 37℃的含 4%多聚甲醛的 PBS，充分混悬细胞，固定 5min。

6）再加入 12ml 含 0.1% BSA 的 PBS，混匀终止反应。

7）1500r/min 离心 10min，弃上清取沉淀（也可用 1ml 含 10% DMSO 的 PBS 悬浮细胞，分装保存于－80℃冰箱备用）。

8）取上述固定的细胞（或复苏冻存的细胞，用含 0.1% BSA 的 PBS 洗涤细胞 2 次），用含 0.1%皂角苷-PBS 悬浮细胞至 1×10^6 个/100μl。

9）室温放置 1h，封闭非特异性结合位点，并增加细胞膜的通透性，以利于荧光素标记的抗细胞因子单抗能进入细胞内与胞质中的细胞因子特异性结合。

10）取 96 孔塑料软板或 V 形底离心管，每孔（管）加入上述细胞悬液 20μl，离心去上清。

11）每孔（管）中加 50μl 同种抗体（染色试验管）、未标记荧光素的抗细胞因子单抗或过量细胞因子（未标记荧光素的单抗或过量的细胞因子可以封闭特异性结合位点，作为阴性对照）。置室温 1h。

12）每孔（管）中加 50μl 荧光素标记的抗细胞因子单抗，4℃作用 30min，用 0.1%皂角苷-PBS 洗涤细胞 3 次（增加细胞通透性），将细胞悬浮于含 0.1% BSA 的 PBS 中，即可进行 FACS 分析。

注意事项

1）标本处理：血液只用肝素钠抗凝，因为枸橼酸钠与 EDTA 等抗凝剂可络合钙，限制钙依赖性激活过程。血样在 8h 内分析，超过 8h 会导致活性的损失，一般细胞因子阳性细胞会减少 5%。如不能在 8h 之内检测，应将真空采血管水平室温放置。试剂中污染的 LPS 是强细胞激活剂，可能会混淆试验结果。

2）刺激激活：检测不同的细胞因子根据情况选择不同的刺激剂组合和刺激时间，以保证最佳的检测效果。例如，要检测 IFN-γ 则可选择 PMA 和 Ionomycin 同时刺激。

3）选择合适的对照：为保证结合的真实和可靠性，设置以下对照。①未刺激对照：激活时由于 BFA 的存在抑制了胞内蛋白的转运，因此在激活过程中产生的抗原与细胞因子会滞留胞内，未刺激对照也应包含 BFA。②激活对照：激活对照使用细胞表面表达 CD69 来评价激活与否，如果未达到 CD69 期望的水平，则激活步骤出了问题，某一试剂可能失活，过期，制备不当或溶剂污染，需制备新鲜刺激剂重新实验。③同型对照：使用与荧光标记抗体相同来源、相同标记、相同剂量和亚型的免疫球蛋白，用于消除由于抗体非特异性结合到细胞表面而产生的背景染色。

4）荧光素的选择：检测相对低表达细胞因子如 IL-4 时，应选用 PE 或 APC 标记；单检测某一细胞因子时最好也选用 PE 或 APC 标记；同时检测多种细胞因子时，弱表达的应选用 PE 或 APC，FITC 标记最好用于高表达细胞因子，如 IFN-γ。

（二）原位杂交法检测细胞内细胞因子

RNA-DNA 原位杂交的原理与其他分子生物学方法相同。但是其他方式都是将 RNA 提取出来后进行分子杂交，而原位杂交则是在细胞内 mRNA 原有位置上进行杂交，细胞则尽可能保持原有形态。将细胞以适当方法固定后，除去脂类并适当消化细胞内的蛋白质，增大细胞对大分子物质的通透性，使 DNA 探针便于出入细胞。与免疫组化相结合，原位杂交可以将显微镜下的组织形态学资料与 DNA、mRNA、蛋白质水平的基因活动联系起来。进行分子杂交后，将玻片上细胞置于显微镜下观察，可确定不同细胞内的基因表达定位情况。

材料与试剂

培养基：不含酚红的 DMEM 培养基

处理玻片：将1%多聚赖氨酸溶液（溶于1mol/L pH7.0 Tris-HCl缓冲液中），涂布于玻片上，干燥后即可立即使用。或者将2ml氨丙基三乙氧基硅烷（APES）溶于100ml丙酮中，浸泡玻片1min，取出晾干，180℃干燥备用

洗涤液：0.1mol/L PBS pH7.2～7.4

细胞固定液：含有1/1000的DEPC、4%多聚甲醛的0.1mol/L PBS pH7.2～7.4

乙醇：70%、90%、100%

二甲苯

1%甲醛

胃蛋白酶溶液：用0.1mol/L HCl将稀释至100μg/ml

结合细胞因子mRNA的DNA探针

地高辛标记试剂盒

杂交液：60%去离子甲酰胺，300mmol/L NaCl、30mmol/L柠檬酸钠、10mmol/L EDTA、25mmol/L NaH_2PO_4（pH7.4），5%葡聚糖硫酸酯，250μg/μl变性鲑精DNA

20%甘油（蒸馏水配制）

2×SSC：1000ml蒸馏水中加17.6g NaCl，8.8g柠檬酸三钠（$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$）

0.5×SSC：300ml蒸馏水中加100ml 2×SSC

0.2×SSC：270ml蒸馏水中加30ml 2×SSC

封闭液：含0.5%羊血清的100mmol/L Tris-HCl pH7.5，150mmol/L NaCl

抗DIG-荧光素抗体

20%甘油（蒸馏水配制）

防褪色溶液：9份甘油与1份染液[1mmol/L Tris-HCl pH7.5，2% 1,4-二氮杂二环[2,2,2]-辛烷（1,4-diaza-bicyelo[2,2,2]-octane），500ng/ml碘化丙啶（propidiumiodide，PI）]混合

烤箱，CO_2培养箱，倒置显微镜，玻璃载玻片（经洗涤，180℃干烤或高温高压灭菌20min），原位杂交专用盖玻片，温箱，水浴锅，染色缸，加样器和吸头等

步骤

1）将细胞滴加在处理的载玻片上，CO_2培养箱中培养，时间通过预实验确定。

2）用洗涤液洗2min×3次，室温下将其放入细胞固定液中固定30～60min。

3）室温下用洗涤液充分洗涤固定细胞（干燥后－20℃冰冻可保存2周以上）。

4）杂交前将固定的细胞进行如下处理：依次在70%、90%、100%乙醇中浸泡脱水，每次5min。用二甲苯洗涤5min，除去残留脂质。依次在100%、90%、70%乙醇中浸泡，进行再水化，每次5min，最后浸泡于洗涤液中。

5）在37℃用胃蛋白酶溶液处理固定的细胞10min，以增加细胞对大分子试剂的通透性，再用洗涤液洗5min。

6）用1%甲醛固定10min，用洗涤液洗净。

7）按地高辛试剂盒说明书用地高辛标记DNA探针。

8）准备杂交液。
9）临用前，将地高辛标记的 DNA 探针在 80℃加热 10min，迅速置冰浴中变性后，将其加入杂交液中，至终浓度 5μg/μl。
10）将 10～20μl 杂交混合液（杂交液加变性探针）加到固定并增加了通透性的细胞上，盖上专用原位杂交盖玻片，放入盛有约 20ml 20%甘油湿盒内 37℃杂交过夜。
11）揭掉盖玻片，用预温到 30～37℃的 SSC 洗涤载玻片上的细胞：2×SSC 5min 2 次，0.5×SSC，15min 1 次，0.2×SSC 15min 1 次。
12）每块载玻片上加 100μl 封闭液，37℃温育 15min，封闭非特异性结合位点。
13）用封闭液按 1∶500 稀释抗 DIG-荧光素抗体，每块载玻片加 10～20μl，置湿盒内 37℃温育 45min，用洗涤液洗 5min×4 次。
14）用 100mmol/L Tris-HCl（pH7.5），150mmol/L NaCl，0.05% Tween 20 洗载玻片。
15）将载玻片依次在 70%、90%、100%乙醇中浸泡 5min 脱水。空气干燥。
16）将载玻片放在防褪色溶液中浸泡 15min，取出封片。
17）表达细胞因子 mRNA 的细胞质着色，在荧光显微镜下观察荧光的分布与强度。

注意事项

1）所有溶液都必须用 RNase 抑制剂（DEPC）处理。
2）经不同处理的较浓的细胞悬液（如 10^7 个/ml）可在玻片上短期培养后固定。亦可在玻片上用药物处理一定量的细胞，培养到预定的处理时间同时细胞长到 90%汇合时再固定。
3）操作中最重要的是及时固定，并在固定液中加入 0.1%DEPC 处理，以抑制 RNase 对 mRNA 的分解作用。此外，过度固定对原位杂交有明显的不利影响。

第八节　细胞因子受体研究技术

细胞因子发挥广泛多样的生物学效应是通过与靶细胞膜表面的受体相结合并将信号传递到细胞内部，了解细胞表达细胞因子受体的状态对于深入掌握细胞因子的生物学功能是必不可少的。除膜结合的细胞因子受体形式外，绝大多数细胞因子受体还存在着可溶性形式，在某些条件下出现的可溶性细胞因子受体的水平升高，可以结合细胞因子，使其不再与膜表面的细胞因子受体结合，因而竞争性封闭了细胞因子的功能。传统的细胞因子受体检测方法大多针对的是膜结合型的受体，但随着细胞因子受体功能研究的深入，可溶性细胞因子受体的检测也逐渐得以发展和重视，检测细胞因子受体的水平已成为基础和临床免疫学研究中的一个重要的方面。

一、膜型细胞因子受体检测方法

细胞因子都是通过与靶细胞表面高亲和力的特异性受体结合后才能发挥其生物学效应的。检测膜表面的细胞因子受体可以了解其在细胞表面的分布、数量及功能状态等，从而可以间接地反映相对应的细胞因子对该细胞的生物学作用。主要的研究方法有以下几种。

（一）细胞吸收试验检测细胞因子受体

原理是将已知的一定量的细胞因子与细胞进行短期共培养，通过检测上清中细胞因子含量的变化间接的判断细胞表面是否参在该细胞因子相应的受体。由于使用的是常规检测细胞因子的方法（见上述），此试验方法简便，但存在一定的局限性，受到的影响因素较多，只能做定性研究，了解细胞表面是否有细胞因子的结合位点。

（二）标记法检测细胞因子受体

一般采用免疫组织化学染色技术（参见第二十六章）或免疫荧光技术（参见第十二章）检测细胞或组织切片中细胞因子受体的定位，产生细胞的频数，甚至可以检测到该分子在胞质、胞膜、上清中浓度改变的动态变化。目前几乎所有的细胞因子受体可用这类方法进行检测。流式细胞仪与间接免疫荧光法相结合检测细胞膜表面细胞因子受体，可获得客观正确的结果。用同位素标记配体或标记抗细胞因子受体的抗体，进行竞争结合试验，可检测细胞因子受体表达的数量以及亲和力大小。常用的标记方法或标记物有磷酸化、地高辛、^{125}I、^{35}S、^{3}H 等。

放射性核素标记研究细胞因子与受体的结合

放射性核素标记细胞因子研究细胞因子与受体结合的动力学是最常用和敏感的方法，可以研究细胞因子与受体结合的亲和力及细胞表达细胞因子受体的数量等。但要注意放射性污染问题，应严格按照放射性操作的规范保护自己和环境以及处理放射性废料。

以下以^{125}I 标记的 IFN-γ 结合 WISH 细胞表面 IFN 受体为例做一介绍。

材料与试剂

RPMI-1640 培养液

含 10％小牛血清、50μg/ml 庆大霉素的 RPMI-1640 培养液（10-1640 培养液）

消化液：含 0.25％ 胰蛋白酶的 0.02％乙二胺四乙酸（EDTA）

^{125}I 标记的 IFN-γ

5％蔗糖溶液（PBS 配制）

22～24℃水浴箱，0.5ml 和 1.5ml 离心管，剪钳，γ 计数仪

步骤

1）用消化液消化对数生长期 WISH 细胞，用 RPMI-1640 培养液洗涤 3 次，每次

2000r/min 离心 5min。用 10-1640 培养液将宣布配成 1×10^{7} 个/ml，细胞置冰浴中。

2）取一半细胞加终浓度 1μg/ml 的未标记 IFN-γ 室温孵育 5min，封闭受体作为阴性对照。

3）用 RPMI-1640 培养液，在 1.5ml 小离心管中倍比稀释标记 ^{125}I 标记的 IFN-γ，每管 50μl（从 2×10^{6}cpm 开始稀释，共 10～12 个稀释度）。每个稀释度 6 管。

4）每个稀释度取 3 管加 60μl 细胞悬液（结合组），另 3 管加 60μl 用未标记 IFN-γ 处理的细胞悬液（阴性对照的非特异结合组）。在 22～24℃ 中结合 70～90min，每 15min 轻轻悬浮细胞一次。

5）在 0.5ml 离心管中加 0.35ml 5%蔗糖溶液。悬浮混匀上述处理的细胞，取 50μl 细胞悬液加在蔗糖溶液上，每个 1.5ml 小离心管中的细胞加到两个含蔗糖的离心管中。在水平离心机上 12 000g 离心 1min。

6）将蔗糖离心管置－80℃或液氮中冰冻。用剪钳剪下离心管底部的沉淀细胞。

7）在 γ 计数仪中分别计数沉淀细胞（结合 cpm）和离心管的其余部分（游离 cpm）的每分钟放射性计数（cpm）。用结合 cpm（y 轴）对游离 cpm（x 轴）作图，可得到结合组、非特异结合组两条曲线。用下式计算特异性结合 cpm，可在图中得到第三条曲线——特异性结合曲线。

特异性结合 cpm＝结合 cpm（结合组）－结合 cpm（非特异性结合组）

特异性结合曲线经过转换，用结合 cpm /游离 cpm（y 轴）对结合 cpm（x 轴）作图，曲线变直线。根据 ^{125}I 标记的 IFN-γ 的 cpm 与 nmol 的对应关系，将直线与 x 轴（结合 cpm）截距的 cpm 值转换为 IFN-γ 的 nmol 数，此 nmol 数即为最大结合（B_{max}），最大结合除以 50μl 中的细胞数，即为平均每个细胞上 IFN-γ 的结合位点数。如果在图中用结合 IFN-γ 的 nmol 值代替 cpm 值，直线的斜率等于 $-K_d$。

注意事项

1）如果用悬浮培养的细胞研究细胞因子与受体的结合，用前用 RPMI-1640 培养液洗 1 次。

2）严格按照放射性操作的规范保护自己和环境以及处理放射性废料。

竞争结合实验检测 IFN 与受体的结合能力

材料与试剂

含10%小牛血清的 DMEM 完全培养液（10-DMEM 培养液）

含 2%小牛血清的 DMEM 完全培养液（2-DMEM 培养液）

IFN-α2 或其他 IFN

^{125}I-IFN-α2

PBS

24 孔细胞培养板，20℃水浴箱，γ 计数仪

步骤

1）用 10-DMEM 培养液将经不同处理的传代细胞或新鲜分离的细胞配成 1.5×10^5 个/ml。
2）取 24 孔细胞培养板，每孔加 1ml 细胞悬液。CO_2 培养箱中培养 16h。
3）用 2-DMEM 培养液 3 倍系列稀释 IFN-α2（从 30nmol/L 稀释到 30pmol/L），共 7 个稀释度。
4）吸弃各孔细胞培养液。每孔各加 1ml 系列稀释的 IFN-α2 或其他 IFN，最大结合孔加 1ml 2-DMEM 培养液，每种处理设 3 复孔。全部孔再加 1nmol/L ^{125}I-IFN-α2（3×10^5 cpm）。
5）20℃水浴箱孵育 30min。用 PBS 洗涤各孔 2 次，洗去未结合的细胞因子。
6）用 0.5ml 消化液 37℃消化细胞 10min。
7）将消化的细胞直接转移到放射计数管中。在 γ 计数仪中计数各管每分钟放射性计数值（cpm）。以最大结合孔的平均 cpm 为 100%结合，各稀释度平均 cpm 所占百分率（cpm 实验/cpm 最大×100%）对 IFN-α2 稀释度（pmol/L）作图。以 50%结合对应的竞争结合浓度（IC_{50}）表示各种 IFN 与 IFN-α2 竞争结合受体的能力。

注意事项

严格按照放射性操作的规范保护自己和环境以及处理放射性废料。

（三）基因水平的研究

可以采用分子生物学的方法检测细胞因子受体的 mRNA，从而了解受体基因转录和表达的情况。如通过核酸标记技术可将细胞因子受体 cDNA 作为基因探针检测细胞内细胞因子受体基因组 DNA 或 mRNA。主要有以下几种方法。

1）应用同位素或其他标记物标记的 cDNA 探针，采用 Northern 印迹或点印迹等方法检查细胞因子 mRNA 水平。
2）应用标记 cDNA 探针与细胞或组织切片进行原位杂交，然后进行放射自显影。
3）细胞因子受体 mRNA 经逆转录为 cDNA，用特异性细胞因子受体引物经 PCR 反应扩增细胞因子受体 cDNA，采用 Southern 印迹方法用标记探针检测特异细胞因子受体 DNA 水平。

也有研究者采用重组细胞因子受体转染或转导至不表达该受体的细胞中进行该受体功能的研究。

（四）细胞因子受体的信号转导研究

细胞因子与细胞膜表面相应的细胞因子受体结合后，通过启动胞内一系列复杂的信号转导通路从而发挥相应的生物学功能，各条转导途径相互影响形成细胞内信号网络，对信号转导的研究有助于了解细胞因子及其受体的结合以及生物学效应的发挥。根据细胞因子受体结构与功能不同分为 5 个不同的超家族，即细胞因子受体超家族、免疫球蛋

白超家族、TNF 受体超家族、酪氨酸激酶（TPK）超家族受体和 G 蛋白偶联受体超家族。结构特征不同的细胞因子受体所介导的信号转导机制不同。与细胞因子的作用密切相关的信号转导途径中，JAK-STAT、PI-3 激酶途径以及 MAP 激酶途径通路较为重要，具体的研究方法参见第二十八章。

二、可溶性细胞因子受体检测方法

可溶性细胞因子受体的检测方法目前多采用 ELISA 法，包括检测血清、体液或细胞培养上清中可溶性细胞因子。商品化的可溶性细胞因子受体检测试剂盒极大地方便了基础研究以及临床诊断，如 IL-1R、IL-6R、TNFR、VEGFR 等。也可利用已有的细胞因子受体单克隆抗体进行 ELISA 的检测（参见第十五章）。

（孙卫民　夏大静　吴艳峰）

参 考 文 献

孙卫民，王惠琴. 1999. 细胞因子研究方法学. 北京：人民卫生出版社.

Dongari-Bagtzoglou A，Fidel PL Jr. 2005. The Host Cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. J Dental Res，84（11）：966～977.

Jung MY，Kim SH，Cho D，et al. 2009. Analysis of the expression profiles of cytokines and cytokine-related genes during the progression of breast cancer growth in mice. Oncol Rep，22（5）：1141～1147.

Mire-Sluis AR，Thorpe R. 1998. Laboratory protocols for the quantitation of cytokines by bioassay using cytokine responsive cell lines. J Immunol Methods，211（2）：199～210.

Moraga I，Harari D，Schreiber G，et al. 2009. Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities. Mol Cell Biol，29（17）：4778～4787.

Vindrieux D，Escobar P，Lazennec G. 2009. Emerging roles of chemokines in prostate cancer. Endocr Relat Cancer，16（3）：663～673.

第十章　人白细胞抗原分型技术

第一节　HLA和HLA分型概述

一、HLA概念

主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）是脊椎动物体内最复杂且具有高度多态性的基因群。MHC的表达产物称为主要组织相容性抗原（MHC抗原），MHC抗原是有核细胞表面膜蛋白分子，主要功能是参与抗原提呈、调控细胞间相互识别及诱导免疫应答。人类MHC称为人白细胞抗原（human leukocyte antigen，HLA）复合体，其编码的产物即人类白细胞抗原（HLA）。

二、HLA抗原分类

HLA复合体由Dausset在1958年首先发现，位于人第6号染色体的短臂上，长度为4cM（centimorgan）。HLA复合体具有多基因性的特点，目前已鉴定出200余个基因座。按照HLA基因座的定位和特点，将其分为3类：HLA-Ⅰ类基因、HLA-Ⅱ类基因和HLA-Ⅲ类基因。每个基因座上的HLA基因均可编码一种HLA抗原。

（一）HLA-Ⅰ类基因

HLA-Ⅰ类基因区包括122个基因座，其中41个为表达基因，12个为候选基因，3个为非编码基因，66个为假基因。根据编码产物分布、功能及多态性不同又可分为经典Ⅰ类基因和非经典Ⅰ类基因。

经典HLA-Ⅰ类基因，又称HLA-Ⅰa，是指最早发现的3个功能基因HLA-A、HLA-B和HLA-C。HLA-Ⅰa基因均具有高度多态性（polymorphism），即同一基因座可能存在两个以上等位基因。截至2009年10月，HLA-A座位被正式命名的等位基因数为893个，HLA-C座位被正式命名的等位基因数为569个，HLA-B座位被正式命名的等位基因数已达1431个，是整个HLA基因区中等位基因数最多的一个基因座，也是多态性最丰富的一个基因座。经典HLA-Ⅰ类基因编码产物是HLA-Ⅰ类分子α链，又称为HLA-Ⅰ类抗原，Ⅰ类抗原是一种膜糖蛋白，存在于所有有核细胞的膜上，以淋巴细胞上的密度最大，主要生物学功能是参与提呈内源性抗原。

非经典HLA-Ⅰ类基因，又称HLA-Ⅰb，包括HLA-E、HLA-F、HLA-G 3个座位。非经典HLA-Ⅰ类基因多态性有限，编码产物分布比较局限，生物学功能尚未完全阐明，其中的HLA-E基因已正式命名有9个等位基因，HLA-F基因已正式命名有21

个等位基因，HLA-G 基因已正式命名有 45 个等位基因。

另外，Ⅰ类基因区还包括 MHC-Ⅰ类多肽相关序列（MHC class Ⅰ polypeptide related sequence，MIC）基因家族，其编码产物是 NK 细胞表面激活型受体的配体。HLA-Ⅰ类基因区内假基因数目很多，占 54.1%（$N=66$），如 HLA-L、HLA-K、HLA-X 等，其生物学功能尚未完全清楚。

（二）HLA-Ⅱ类基因

HLA-Ⅱ类基因区包含 34 个基因座，其中 16 个为表达基因，3 个为候选基因，15 个为假基因。经典的 HLA-Ⅱ类基因包括 HLA-DR、HLA-DQ 和 HLA-DP，它们也具有高度多态性，并且由双座位等位基因构成。DR 亚区有 1 个 DRA 基因及 9 个 DRB 基因。DRA 基因不具多态性，其产物为 DR 分子的 α 链。9 个 DRB 基因分别命名为 DRB1-DRB9。其中 DRB1、DRB3、DRB4 和 DRB5 为功能基因。DRB1 是Ⅱ类区域中多态性最丰富的座位，等位基因数已达 722 个。DRB1 基因编码的 DR 分子 β 链与 DRA 基因编码的 α 链共同组成 DR 分子。经典的 HLA-Ⅱ类基因编码产物称为 HLA-Ⅱ类抗原，主要表达在 B 细胞、巨噬细胞和其他抗原提呈细胞上，其主要生物学功能是参与提呈外源性抗原。

非经典 HLA-Ⅱ类基因包括 HLA-DM、HLA-DO、抗原加工相关转运体（transporter associated with antigen processing，TAP）基因及 TAP 结合蛋白（TAP-binding protein，TAPBP，又称 tapasin）基因等，这些基因编码产物的主要生物学功能是参与抗原加工和转运。其中 HLA-DM 基因编码产物主要存在于特定的细胞器——MHC-Ⅱ类腔室（MⅡC）中，在外源性抗原加工提呈中起重要而独特的作用。抗原加工相关转运体基因编码产物表达于内质网膜，负责抗原肽向内质网腔转运。HLA-DO 基因编码产物的确切功能尚不清楚，可能对 HLA-DM 功能实施负调节。

（三）HLA-Ⅲ类基因

HLA-Ⅲ类基因区位于Ⅰ类和Ⅱ类基因区之间，包含 62 个基因座，是整个基因组中基因密度最大的一个区域。Ⅲ类基因区的表达基因包括编码部分补体的基因以及编码炎症相关分子、肿瘤坏死因子、热激蛋白等产物的基因。有些产物发挥重要生物学功能，如参与细胞转录调节、管家、生物合成、电子转移、显示水介活性以及介导蛋白质-蛋白质间的相互作用。近期有学者建议将在Ⅲ类基因区靠近端粒端的一些基因，包括 TNF、LTA、LTB、SHP 等划归为 HLA-Ⅳ类基因区或炎症基因区，以突出这些基因的功能及其与各种应急、感染及炎症反应的关系。

三、HLA 遗传特点

HLA 具有复杂的多态性，指在同一相互交配的群体中，同一基因座可以编码两种以上基因产物。HLA 的多态性主要是由复等位基因和共显性遗传所致。位于一对同源染色体上对应位置的一对基因叫等位基因，由于群体的突变，同一基因座上的基因系列称为复等位基因（multiple allele），HLA 复合体的每个基因座上均有很多复等位基因，

并且均为共显性（co-dominant）表达，即两条染色体同一基因座每一等位基因均为显性基因，均能编码特异性蛋白质。共显性表达极大地增加了 HLA 抗原系统的复杂性，所以 HLA 复合体是目前已知的人体中最复杂的遗传多态性系统。

HLA 复合体另一个遗传特点是单元型（haplotype）遗传。同一条染色体上紧密连锁的一系列等位基因的特殊组合构成单元型，单元型是将 HLA 遗传信息传给子代的基本单位。由于 HLA 基因位于同一条染色体上，其多基因座上的基因型组合相对稳定，在遗传过程中一般不发生同源染色体互换。那么，按中国人常见的 A 座位基因有 13 个，B 座位基因有 30 个计算，可组成的单元型有 13×30＝390 种之多。理论上估计，父母各将一串单元型给子女，便会形成 4.3 万种 HLA-AB 血型。而实际上，HLA 各基因并非完全随机地组成单元型，而是某些等位基因比其他等位基因更多或更少地连锁在一起，即呈现出连锁不平衡（linkage disequilibrium，LD）的特点，因此人群中实际存在的单元型总数少于理论值。

四、HLA 分型及医学应用

HLA 分型即确定 HLA-Ⅰ类和 HLA-Ⅱ类等位基因或产物的特异性。因为 HLA 复合体复杂的多态性，HLA 分型技术在医学临床应用上有重要的意义。例如，同种异体间器官移植的成败在很大程度上取决于供体和受体间 HLA 型别的差异，所以器官移植和骨髓移植前必须进行供者和受者的 HLA 配型。自 1987 年以来，HLA-A、HLA-B 和 HLA-DRB1 六位点的配型已被作为器官移植的标准配型；另外，HLA 与某些疾病具有关联性，特别是自身免疫性疾病，以及成分输血时 HLA 抗体不符会导致输血副作用等；近年来，HLA 分型技术也成为亲子鉴定和犯罪法医学鉴定，以及遗传学方面研究人类进化的重要手段。

HLA 分型技术主要包括血清学分型技术、细胞学分型技术和 DNA 分型技术。像 HLA-Ⅰ类抗原中的 HLA-A、HLA-B、HLA-C 抗原和 HLA-Ⅱ类抗原中的 HLA-DR、HLA-DQ 抗原可用血清学方法分型，HLA-Ⅱ类抗原中的 DP 和 Dw 抗原（Dw 代表激发同种异体淋巴细胞增殖的淋巴细胞激活表位，是 DR、DQ 等Ⅱ类基因产物的效应，但不存在单独的 Dw 基因座）以往多采用细胞学分型方法，这前两种分型方法主要侧重于分析 HLA 产物的特异性。20 世纪 80 年代以来，HLA 进入了分子水平研究阶段，进展尤为显著，进而诞生了 DNA 分型技术，该分型技术利用分子生物学技术，可以在基因水平对 HLA-Ⅰ、HLA-Ⅱ类抗原的等位基因进行精细的分型，使 HLA 分型技术更为简便、快捷和精确。

第二节　血清学分型技术

血清学分型是一项古老的分型技术，该方法于 1956 年由 Gorer 提出，1964 年由 Terasaki 等进行改良。虽然近年来已建立许多新的分型技术，但血清学分型一直是 HLA-Ⅰ类抗原分型的经典方法，至今在器官移植配型中仍起着十分重要的作用。WHO-HLA 系统命名委员会发布的资料显示：用该方法检测的特异性 HLA 抗原有 161

种。

由于血清学分型建立在多肽的水平上，分型准确性依赖于分辨力良好的标准分型血清，不可避免地有一定的局限性。随着对Ⅰ类分子核苷酸序列分析的不断深入，新确立的特异性位点逐年增加，血清学方法已无法获得能够分辨出所有特异性位点的标准分型血清。同时，标准分型抗体亲和力较弱、效价较低、易产生交叉反应，以及某些病理过程会导致外周血淋巴细胞表面抗原的弱表达或抗原性质发生改变，都会使分型出现技术上的困难和判断误差。有报告显示，HLA-A 基因血清学分型总误差率为 8.95%，HLA-B 基因血清学分型总误差率为 13.14%，HLA-DR 基因血清学分型总误差率为 30.2%。而且，许多被血清学确定为空白的 HLA 型别事实上均有特异性等位基因存在。上述因素均严重影响了 HLA 分型结果的可靠性及该技术的推广应用。

血清学分型借助微量淋巴细胞毒试验（microlymphocytotoxicity test）或称补体依赖的细胞毒试验（complement dependent cytotoxicity test，CDC），依据特异性抗体介导的补体系统对靶细胞溶解的原理，从经产妇血清中筛选出 HLA 抗原特异性的抗血清（分型血清），作为抗体加入待检者外周血淋巴细胞中，在补体的参与下充分作用，最后加入活性染料。当淋巴细胞表面具有相应 HLA 抗原时，特异性抗体（IgG 或 IgM）与淋巴细胞膜上相应的 HLA 抗原结合，激活补体，改变细胞膜的通透性，造成细胞死亡，染料容易进入细胞；如果淋巴细胞膜上无相应的 HLA 抗原，则不会改变细胞膜的通透性，细胞存活，染料不进入细胞。在倒置显微镜下观察，死亡细胞着色，活细胞不着色，因此，根据待检淋巴细胞的死活判定其表面是否具有与分型血清中抗体相对应的 HLA 抗原。

一、HLA-A、HLA-B、HLA-C 抗原的血清学分型方法

HLA-Ⅰ类抗原包括 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 抗原，其经典并且至今常用的分型方法就是血清学分型。通过大量筛选和全世界范围的血清交换，目前已有商业性的标准 HLA 分型血清及 HLA 分型板出售，使血清学分型更加便捷有效。

材料与试剂

淋巴细胞分离液（相对密度 1.077～1.080）
标准 HLA 分型血清
HLA 分型板
兔补体
对照血清：阳性对照为马抗人淋巴细胞血清，阴性对照为不含 HLA 抗体的、经 56℃ 30min 灭活处理的 AB 型人血清
5%伊红水溶液：5.0g 伊红-Y 溶于 100ml 重蒸水中，用滤纸过滤 2～3 次后使用
中性福尔马林：37%甲醛以 1mol/L NaOH 调节至 pH7.2，配成 10%浓度
RPMI-1640 培养液

步骤

1）用淋巴细胞分离液按常规方法从待检者肝素抗凝血中分离出淋巴细胞（参见第

四章)，用 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 2×10^6 个/ml。

2）取 HLA 分型板，每孔加入无细胞毒性的液体石蜡 5～8μl 和标准 HLA 分型血清 1μl。同时设阳性血清对照、阴性血清对照（各加 1μl）及补体对照（不加血清）。

3）分型板每孔加入待检淋巴细胞 1μl（2000～2500 个细胞）。

4）将分型板置室温 30min。

5）各孔加入家兔补体 5μl，轻轻摇匀，置室温 60min。

6）各孔加入 5%伊红水溶液 2～3μl，轻轻摇匀，室温染色 5min。

7）各孔加 10%中性福尔马林 10μl，固定细胞和终止反应。

8）分型板用倒置相差显微镜观察：阳性细胞（死细胞）呈暗红色，肿大，不折光；阴性细胞（活细胞）不着色，不肿大，有折光性。

9）判定结果：以阳性细胞（死细胞）的百分数为判定标准。0～10%为阴性；11%～20%为阴性可疑；21%～40%为弱阳性；41%～80%为阳性；81%～100%为强阳性。

注意事项

1）HLA 标准分型血清取自多次经产妇或计划免疫志愿者的血清进行筛选，所得分型抗血清须经标准品鉴定。

2）补体质量对 HLA 分型结果影响很大，为保证补体活力应避免反复冻融。用量不能少于 5μl。

3）T、B 淋巴细胞膜上都存在 HLA-A、HLA-B、HLA-C 抗原，因此检查这些抗原可以用全血分离的混合淋巴细胞。

4）控制好反应时间和温度，低于 20℃和反应时间不足将产生假阴性结果，高于 37℃和反应时间过长易产生假阳性结果。

5）HLA 抗原抗体反应有一最适比例，可通过预试验找出最佳比例。

二、HLA-DR、HLA-DQ 抗原的血清学分型方法

HLA-Ⅱ类抗原包括 HLA-DR、HLA-DQ 和 HLA-DP 抗原，用血清学分型难度较大。因为 HLA-Ⅱ类抗原在未活化的 T 细胞上不表达，需要先分离和纯化 B 细胞以供检测；HLA-Ⅱ类抗原多态性由双座位等位基因构成，使得准确判定相应等位基因产物的抗原特异性十分困难；另外，血清型分型很难用于确定 HLA-DP 基因产物的多态性。目前 HLA-DR 和 HLA-DQ 抗原仍在应用血清学分型，特别是应用单克隆抗体作为分型抗体（即将 HLA 单克隆抗体包被在分型板上再进行补体依赖的细胞毒试验）后获得了良好效果。

HLA-DR、HLA-DQ 抗原主要存在于 B 细胞和单核细胞上，血清学分型时一般从混合淋巴细胞中分离出 B 淋巴细胞用于分型检测。并且利用血小板表面只表达 HLA-Ⅰ类抗原这一特点，将 HLA-DR、HLA-DQ 抗原分型所用抗血清经过浓集血小板处理以吸收去除针对Ⅰ类抗原的抗体，从而避免 HLA-Ⅰ类抗原抗体反应造成的假阳性。

材料与试剂

淋巴细胞分离液，相对密度为1.077～1.080

血小板悬液

抗DR、DQ血清

HLA分型板

兔补体

5%伊红水溶液：同HLA-A、HLA-B、HLA-C抗原分型

中性福尔马林：同HLA-A、HLA-B、HLA-C抗原分型

RPMI-1640培养液

步骤

1）血小板悬液配制：采集静脉血于20倍量的5%EDTA中（1∶20稀释血标本），4℃下1500r/min离心10min。取含血小板的上清，再4℃下2500r/min离心30min，取血小板沉淀物用5%EDTA重新悬浮，再4℃下2500r/min离心30min，弃上清，缓慢加入5ml 1%草酸铵悬浮血小板，静止10min后，4℃下2500r/min离心30min，用生理盐水将血小板洗2次，用0.1%NaN_3-PBS重悬，调整浓度至1×10^9个/ml，分装，4℃储存不超过3周。

2）抗DR、DQ血清配制：取自多次经产妇或计划志愿免疫者的血清，再用如上制备的血小板吸收除去针对HLA-Ⅰ类抗原的抗体，即先将抗血清与等量1×10^9个/ml血小板悬液混合，37℃孵育60min。置4℃过夜，离心，取上清分装。

3）B淋巴细胞分离和纯化（参见第五章），取待测B淋巴细胞，用RPMI-1640培养液调整细胞浓度至2×10^6个/ml。

4）各取1μl抗血清和B淋巴细胞（2000～2500个细胞）悬液，于分型板中在37℃温育60min。

5）加入5μl兔补体，混匀，37℃温育120min。

6）各孔加入5%伊红水溶液2～3μl，轻轻摇匀，室温染色5min。

7）各孔加10%中性福尔马林10μl，固定细胞和终止反应。

8）分型板用倒置相差显微镜观察：判定结果同HLA-A、HLA-B、HLA-C抗原分型。

注意事项

1）B淋巴细胞悬液制备过程应严格控制，T淋巴细胞或粒细胞污染对分型结果影响很大。

2）控制好反应时间和温度，37℃是最适反应温度。

第三节 细胞学分型技术

HLA-Ⅱ类抗原中的Dw和DP抗原过去采用细胞学方法分型，分别是纯合子分型

细胞法（homozygous typing cell，HTC）和预致敏淋巴细胞定型法（primed lymphocyte typing，PLT）。这两种方法的基本原理均是两个 HLA-D 抗原型别不一致的个体的淋巴细胞在一起混合培养时，会相互刺激致对方母细胞化，从而可通过测定淋巴细胞在识别非己 HLA 抗原决定簇后发生的增殖反应来分析型别。由于分型细胞来源困难以及操作方法繁琐等缺点，细胞学分型技术正被逐渐淘汰。这里仅简单介绍分型方法和判定标准。

一、纯合子细胞分型法

纯合子细胞分型法用于 HLA-Dw 抗原的分型。混合淋巴细胞培养（mixed lymphocyte culture，MLC）有双向和单向两种，双向法是直接把未做任何处理的两份淋巴细胞混合培养，单向法是先把一份淋巴细胞用丝裂霉素或 X 射线照射，使其失去增殖能力，但仍保持刺激能力，再与另一份淋巴细胞混合培养。纯合子细胞分型法采用单向混合淋巴细胞培养，即将已知型别的 HLA-Dw 纯合子分型细胞（HTC）经过 X 射线照射或丝裂霉素 C 处理，使其失去增殖能力，作为刺激细胞；而以受检者的外周血淋巴细胞作为反应细胞。将这两种细胞在体外进行混合淋巴细胞培养，用^{3}H-TdR 掺入法测定细胞增殖反应的程度。如受检细胞受到 HTC 刺激后，不发生或仅出现轻微的增殖反应（double normalized value，DNV），小于 30%，表明受检者细胞具有与 HTC 相同的 HLA-Dw 抗原。因此这种分型又称为阴性分型（negative typing）。

二、预致敏淋巴细胞定型法

预致敏淋巴细胞定型法用于 HLA-DP 抗原的分型鉴定。首先将反应性淋巴细胞分别与一系列 HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-Dw、HLA-DR 或 HLA-DQ 分型一致，但 HLA-DP 分型不同的刺激性淋巴细胞混合一起培养 9～12d，使之成为致敏的淋巴细胞，然后用液氮冷冻保存待用。分型时，以预致敏淋巴细胞作为反应细胞，受检者淋巴细胞经过 X 射线照射或丝裂霉素 C 处理后作为刺激细胞，将两种细胞进行混合淋巴细胞培养。当受检者淋巴细胞与预致敏淋巴细胞具有相同的 HLA-DP 抗原时，后者即产生强烈的增殖反应，相对参考反应（relative reference response，RRR）达到 60%～80%判定为阳性，据此可以得知受检者细胞的 HLA-DP 抗原型别。因此这种分型又称为阳性分型（positive typing）。

上述纯合子细胞分型法和预致敏淋巴细胞定型法均采用单向混合淋巴细胞反应，实际在临床器官移植工作中，为了检查供、受体的组织相容性是否配合，可以采用双向混合淋巴细胞培养方法，即直接将未经任何处理的两个体的淋巴细胞进行混合培养，双方淋巴细胞都具有刺激能力和反应能力，如两者的组织相容性互相配合，则相互刺激作用很小，细胞无明显增殖反应；反之，如二者的组织相容性不配合，则相互刺激使细胞被活化并发生增殖，增殖反应的强度与两个体组织相容性不配合程度成正比。

第四节　DNA 分型技术

由于血清学分型技术的局限性和细胞学分型技术的不精确性，近年来国内外已将 HLA 分型技术由经典的血清学和细胞学技术转向分子生物学技术。传统的血清学分型工作是研究 HLA 的基础，但血清学的表型相同，DNA 的核苷酸序列不一定完全相同。HLA 的个体遗传学差异的本质不是血清学方法所检测的基因产物，而是在编码基因产物的 DNA 水平上。体外 DNA 扩增技术——聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）的创立及其在生物医学中的广泛应用，使得从 DNA 水平研究 HLA 成为可能。因此，应用分子生物学技术，在 DNA 水平上进行 HLA 分型正逐步取代血清学和细胞学方法。1991 年第 11 届国际 HLA 专题讨论会正式提出了 HLA 的 DNA 分型技术，目前常用的 DNA 分型方法有限制性片段长度多态性-聚合酶链反应（RFLP-PCR）、单链构象多态性-聚合酶链反应（SSCP-PCR）、序列特异性寡核苷酸-聚合酶链反应（SSO-PCR）、序列特异性引物-聚合酶链反应（SSP-PCR）及 PCR-指纹图谱等。由于 DNA 分型技术的试剂配制和操作步骤均遵循分子生物学技术的相关实验方法，在这里就不再进行详述。本节主要介绍多种 DNA 分型技术的原理、应用及其优缺点。

一、限制性片段长度多态性-聚合酶链反应

限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）是第一个建立的对多态性进行检测的 DNA 分析技术，RFLP-PCR 是在 RFLP 检测技术分析方法的基础上发展的一种更为简便和精确的 HLA 分型技术。RFLP 的原理是个体间抗原特异性取决于氨基酸的组成，后者的不同由编码基因的碱基序列差异所致，这种碱基顺序的差别造成限制性内切核酸酶识别位点及酶切位点的数目发生改变，从而产生数量和长度不一的 DNA 酶切片段，用特异性探针对整个基因组 DNA 酶切片段进行杂交，便可分析限制性长度片段多态性。

RFLP-PCR 的特点是将目的基因片段 PCR 扩增后，再利用多种限制性内切核酸酶对扩增产物进行酶切，酶切片段可直接在凝胶电泳上进行分辨。相对于 RFLP 检测技术，RFLP-PCR 提高了目的 DNA 的含量和相对特异性，从而大大提高了灵敏度，而且操作方法简便，所需设备较为简单，分型时间短，特别适用于个别标本或小样本的研究。其缺点是有时 PCR 扩增产物不能被限制酶有效地消化切割，选择什么样的限制酶来消化和区分所有的等位基因比较困难；电泳条件也难掌握，等长的消化片段或微小片段难以区分；无法分辨杂合子，只能区分有限的多态性。

二、序列特异性寡核苷酸-聚合酶链反应

序列特异性寡核苷酸-聚合酶链反应（SSO-PCR）又称 ASO-PCR。其原理是，先 PCR 扩增待检细胞的 HLA 基因片段，再用放射性核素标记或非放射性物质标记的、人工合成的序列特异的寡核苷酸探针（sequence-specific oligonucleotide probe hybridization，SSO）或等位基因特异性的寡核苷酸探针（allele specific oligonuceotide，ASO）

杂交。如果 HLA 基因片段与已知核苷酸序列的探针互补，则二者结合并在 X 线底片上显影，反之则不显影，根据阳性斑点可判断个体 HLA 基因型。

该方法中探针与基因片段杂交有正向杂交和反向杂交两种类型。正向杂交是将 PCR 扩增的待测基因片段固定于杂交膜（硝酸纤维素膜或尼龙膜）上，然后与探针杂交。由于 HLA 等位基因非常多，就需要很多的探针对每个待测基因片段进行多次杂交才能完成定型分析，操作比较繁琐。反向杂交是将各种不同的非标记探针固定于同一张杂交膜上，然后与带有标记物或标记底物的 PCR 产物杂交，这样一次杂交即可完成多个等位基因分析。

由于 PCR 技术可将 HLA 复合体上指定基因片段特异性地扩增 5 或 6 个数量级，专门设计的 SSO 探针又能探测出等位基因间 1 或 2 个核苷酸的差异，所以 SSO-PCR 具有灵敏度高、特异性强、需样本量少及易于普及等优点，适宜大量和高纯度样本，并且杂交条带可以作为书面原始记录长期保存。SSO-PCR 是目前应用最多的一种 HLA-Ⅱ类抗原分型方法，能鉴定所有已知序列的 HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP 等位基因，精确地分析 DNA 的多态性。该方法的缺点是不同探针的杂交条件（如温度、离子强度等）和洗涤条件都不同，易出现误差；SSO 探针只能基于已经发现的等位基因序列而设计，对尚未发现的 HLA 新的等位基因，SSO-PCR 技术虽然可以通过其新的杂交格局来发现，但点杂交常有假阳性，当一个样本在某个位点只检出一个等位基因时，不易确定其为纯合基因型或是含一个空白基因的杂合子。此外，应用 PCR-SSO 研究杂合子群体 HLA-DR 的多态性时，常不能区分具有相同序列的不同 DRB 等位基因。

三、序列特异性引物-聚合酶链反应

序列特异性引物（sequence-specific primer，SSP）即根据 HLA 各等位基因的核苷酸序列设计的一套针对每一等位基因特异性（allele-specific）或组特异性（group-specific）的引物，主要是针对各等位基因第二外显子区域的多态性，用 SSP 扩增出来的产物具有等位基因特异性。序列特异性引物-聚合酶链反应（SSP-PCR）的基本原理就是利用一套序列特异性引物 PCR 扩增各种 HLA 等位基因，由于特异性引物仅扩增与其相应的等位基因，而不扩增其他的等位基因，因此，判定 PCR 扩增产物的有无即可鉴定特异性等位基因，这种 PCR 扩增产物可通过琼脂糖凝胶电泳直接观察分析。

SSP-PCR 分型方法操作简单快速、成本低，实验结果容易判断，杂合子也很易检出。其缺点是不易自动化，为检出所有的等位基因，必须用多个引物进行扩增，并且不能检测新的等位基因。故此方法适宜于零散和纯度低的样本。针对 HLA 基因外显子和内含子序列精心设计引物可以有效增加该方法的精确性。

四、单链构象多态性-聚合酶链反应

不同于前述几种基于核苷酸序列识别的 DNA 分型技术，单链构象多态性-聚合酶链反应（PCR-single strand conformation polymorphism，SSCP-PCR）是基于核酸分子构型的分型技术。其原理是单链 DNA 在溶液中形成立体构象，等长的 DNA 片段因其序列中核苷酸的组成和排列顺序不同，形成不同的构象，在不含变性剂的中性聚丙烯酰

胺凝胶电泳中表现为电泳迁移率的差别，可通过放射自显影或银染显色来进行分析。

SSCP-PCR是最常用的根据基因构型进行分型的方法。该方法首先要完成目的DNA的PCR扩增，然后将扩增的目标产物变性后形成单链DNA，不同的DNA序列，甚至仅有一个碱基的差异，就会形成不同的茎环结构，从而导致电泳速率的不同。基于序列分子构型的分型方法在理论上就避开了杂合子这个难题。通过PCR扩增包括发生单个碱基置换的部位及两侧DNA片段，变性后进行SSCP分析，从理论上讲可以分辨出单个碱基的差异，有效地检出点突变和DNA多态性，有利于探测新的等位基因。因此，SSCP-PCR已成功地应用于分析HLA-DQA1和HLA-DQB1的多态性、HLA-DPA1的各等位基因及HLA-DPB1亚型的分辨；SSCP-PCR还可以发现和确定HLA-DP位点中的新等位基因或变异体。在HLA-DR4亚型等位基因分析中，SSCP-PCR也具有独特的价值。在相差几个碱基甚至1～2个碱基的亚型分析中，SSCP-PCR具有相对简捷而精确的特点。在异基因骨髓移植的配型中已初步应用于临床。

但此方法仅限于分辨200～300bp的目的基因，并且即使是同一单链DNA在相同情况下也会形成不同的构型，使得电泳条带很难分析；也有可能会出现当某些位置的点突变对单链DNA分子立体构象的改变不起作用或作用很小的情况，使聚丙烯酰胺凝胶电泳无法分辨造成漏检。

目前，SSCP-PCR作为SSO-PCR的一个补充，用于区分纯合基因和空白基因，排除SSO杂交的假阳性和部分假阴性，对于完善HLA的DNA分型有重要意义，还可以克服SSO-PCR在小样本鉴定中费时、费钱的缺点。

五、PCR-指纹图谱

PCR-指纹图谱（PCR-finger printing）又称为PCR-异源二聚体电泳多态性（heteroduplex analysis，HA）分型，是另一种基于核酸分子构型的分型方法。其原理是在DNA特异性扩增最后一个循环的退火阶段，单链DNA除了形成同一个体完全互补的同质双链DNA外，某些单链DNA还可以与不同个体的单链DNA形成不完全互补的双链。由于不同个体的DNA具有不同的分子构象，根据异源二聚体未配对区域的长度和分布而显示出电泳条带不同，故在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈现个体特异的电泳图谱。

在临床HLA基因分型时，将供、受者的DNA扩增产物混合进行交叉配型，电泳后得出的指纹图谱再与供、受者各自的指纹图谱作比较，从中选择指纹图谱一致者进行骨髓或器官移植，因此，该项技术常用于非亲缘关系供、受者器官移植的快速配型。

这是一种简单快速的HLA配型方法，用电泳图谱直接分析PCR产物，又避免了限制性内切核酸酶与探针等昂贵试剂的使用，但其分析的对象是一组基因，因此不能确定个体间等位基因的差别。

六、基因芯片

基因芯片技术是将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针，有规律地排列固定于某种支持物上，然后与待测的标记过的样本基因进行特异性杂交，通过激光共聚焦

荧光检测系统对芯片进行扫描，并配以计算机系统对每一个探针上的荧光信号进行检测，从而得出大量信息。

基因芯片在几平方毫米的面积上可以固定几百个 HLA 分型探针，与 SSO-PCR 方法所用的杂交膜比较起来具有缩微化的优势。基因芯片技术只需要一张芯片、一次 PCR、一次杂交，就可以对一个或多个样本进行 HLA-A、HLA-B、HLA-DR、HLA-DQ 等位点的基因分型，即具有高通量和平行化的特点；其次，杂交、洗脱过程非常简单，杂交结果用扫描仪直接扫描，非常直观；另外，由于固定在芯片上的探针量和 PCR 所用的样本量很小，并且芯片可以实现单片多人份，所以成本较低，最后，基因芯片的许多操作均为机器化流水作业，自动化程度较高。这些会促使 HLA 基因芯片分型技术在临床上得到广泛应用。但是，目前基因芯片还存在着仪器设备昂贵、方法有待标准化以及信号检测低等不足。

七、展望

HLA 分子的不匹配是导致异体器官移植排斥的主要原因，同时 HLA 的基因型同许多自身免疫疾病和传染病有关，无论是临床检验还是科学研究都越来越需要高精度的 HLA 分型手段。

近年来，随着分子生物学许多新技术的应用，HLA 分型方法发展迅速。目前，SSP-PCR、SSO-PCR 和 SBT-PCR（sequencing-based typing）是国际主要组织相容性工作小组（International Histocompatibilty Working Group，IHWG）所推荐的 3 种标准 HLA 分型方法。SBT 分型技术是一种通过对扩增后的 DNA 进行核酸序列测定，与数据库中核酸序列进行比对，从而判断 HLA 型别的方法，同时可以有效地检测 HLA 新基因座。由于它提供的是数字信号而非模拟信号，因此是最直观、最准确、分辨率最高的方法，被誉为 HLA 分型国际“金标准”。这种方法已经成为国外组织配型实验室的必备技术，但是由于技术难度较高、测序仪器和 SBT 试剂盒价格昂贵，影响了其在国内的应用。近期专门的 HLA 分型软件与自动上样的固相测序试剂盒面世，所以随着自动核酸测序成本的降低，这一分型技术将被国内广泛应用。

另外，提取基因组模板的技术也在不断发展。用于分型的 DNA 来源也已不局限于血液，口腔涂片、唾液中提取的 DNA 也有相似的效果。针对微量基因组模板的情况，现已开发出基于滚环复制的全基因组扩增技术，可以将 1ng 的模板扩大至 100ng，足以应付众多分型技术的要求。

总之，各种 DNA 分型技术各有优劣，如能相互配合使用，将优势互补，则能大大提高分型能力。相信随着各学科之间的渗透与交叉，未来 HLA 分型技术会向着更便捷、更准确的方向前进。

（占贞贞）

参 考 文 献

龚非力. 2003. 医学免疫学. 北京：科学出版社.

何丽，王世鑫．2006．HLA分型方法的研究进展．免疫学杂志，22（3）：90～93．

沈关心，周汝麟．2002．现代免疫学实验技术．第二版．长沙：湖北科学技术出版社．

谭建明．1994．DNA水平的HLA-Ⅱ类抗原配型研究进展．国外医学·泌尿系统分册，14：21．

武建国．1989．实用临床免疫学检验．南京：江苏科学技术出版社．

杨春森．1997．HLA基因分型方法进展．中国输血杂志，10（2）：108～110．

朱立平，陈学清．2000．免疫学常用实验方法．北京：人民军医出版社．

Dinauer DM，Luhm RA，Uzgiris AJ，et al. 2000. Sequence-based typing of HLA class Ⅱ DQB1. Tissue Antigens，55（4）：364～368.

Guo Z，Hood L，Petersdorf EW，et al. 1999. Oligonucleotide arrays for high resolution HLA typing. Rev Immunogene，1（2）：220～230.

Holdsworth R，Hurley CK，Marsh SGE，et al. 2009. The HLA dictionary 2008：a summary of HLA-A，-B，-C，-DRB1/3/4/5，and-DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A，-B，-C，-DR，and -DQ antigens. Tissue Antigens，73：95～170.

Lillo R，Balas A，Vicario JL，et al. 2002. Two new HLA class Ⅰ alleles recognized by PCR sequence-specific primer and sequencing based typing：B33805 and Cw30408. Tissue Antigens，59（1）：47～48.

Olerup O，Zetterquist H. 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers（PCR-SSP）in 2 hours：an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens，39（5）：225～235.

Park MH，Whang DH，Kang SJ，et al. 1999. High resolution HLA2DQB1 typing by combination of PCR-RFLP and PCR-SSCP. Hum Immunol，60（9）：901～907.

第十一章 模式识别受体

病原入侵时宿主初始T淋巴细胞、B淋巴细胞的活化及其效应物质的产生需要1～2周的时间，在此之前固有免疫细胞及其介导的免疫学效应是宿主抗感染、清除病原的主要武器。与T淋巴细胞和B淋巴细胞不同，固有免疫细胞不表达病原抗原特异性的受体。但是，针对多种多样的病原，固有免疫细胞可以有效识别并启动固有免疫反应。20世纪90年代Toll样受体的发现，使人们首次认识到模式识别受体是固有免疫细胞识别病原的分子基础。

第一节 模式识别受体的种类

种类繁多的病原生物具有某些分子结构相似的保守成分，这些保守成分被称为病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern，PAMP）。固有免疫细胞表达一类被称为模式识别受体的分子（pattern recognition receptor，PRR），这些受体可以识别病原入侵时暴露或释放的病原相关分子模式，传递活化信号，促进固有免疫细胞对病原的吞噬，诱导细胞因子、趋化因子、Ⅰ型干扰素等免疫活性介质的产生，从而启动固有免疫反应的发生。

目前已经发现的模式识别受体被分为Toll样受体（Toll-like receptor，TLR）、RIG-Ⅰ样受体（retinoic acid-inducible gene-I-like receptor，RLR）、C型凝集素受体（C-type lectin receptor，CLR）和核苷酸结合寡聚域样受体［nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor，NLR］等几种类型（表11-1）。这些模式识

表11-1 哺乳动物模式识别受体和它们的主要配体

模式识别受体	受体	配体
Toll样受体(TLR)	TLR1	三酰脂肽
	TLR2	胞壁酸,酵母多糖,脂蛋白
	TLR3	双链RNA，polyI：C
	TLR4	脂多糖
	TLR5	鞭毛蛋白
	TLR6	二酰脂肽
	TLR7	单链RNA，R848
	TLR8	单链RNA，R848
	TLR9	CpG DNA
	TLR11	肌动蛋白抑制蛋白profilin样蛋白

续表

模式识别受体	受体	配体
C 型凝集素受体（CLR）	MR	配体负载的甘露糖，岩藻糖，*N*-乙酰氨基葡萄糖
	DC-SIGN	细胞黏附分子2/3，HIV 包膜糖蛋白 gp120，结核分枝杆菌来源的 ManLAM
	Dectin-1	酵母多糖，真菌来源的 β-葡聚糖
清道夫受体（SR）	SR	修饰的低密度脂蛋白，凋亡细胞
	MARCO	修饰的低密度脂蛋白
	CD36	氧化低密度脂蛋白，凋亡细胞
CARD 解螺旋酶	RIG-I	5′-ppp-RNA
	MDA5	poly I：C，脑炎心肌炎病毒双链 RNA
NOD 样受体（NLR）	NOD1	γ-右旋谷氨酰-内消旋二氨基庚二酸多肽
	NOD2	胞壁酰二肽
	IPAF	沙门氏菌属鞭毛蛋白
	NAIP5	军团杆菌属鞭毛蛋白
	NAIP1	细胞碎片
	NAIP1b	炭疽致死毒素
	NALP3	细菌 mRNA，R848，外源性 ATP，尿酸结晶
DAI	DAI	双链 DNA
AIM2	AIM2	双链 DNA
RNA 聚合酶Ⅲ	RNA 聚合酶Ⅲ	双链 DNA

TLR：Toll-like receptor；CLR：C-type lectin receptor；MR：mannose receptor；DC-SIGN：DC-specific ICAM-grabbing non-integrin；ManLAM：mannose-capped lipoarabinomannan；SR：scavenger receptor；MARCO：macrophage receptor with collagenous structure；CARD：caspase-recruiting domain；RIG-I：retinoic acid-inducible gene I；MDA5：melanoma differentiation-associated gene 5；NLR：NOD-like receptor；IPAF：ICE protease-activating factor；NAIP：neuronal apoptosis inhibitor protein；NALP：NACHT-，LRR-and PYD-containing protein；DAI：DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors；AIM2：absent in melanoma 2。

别受体表达于细胞膜表面或胞质内，识别不同种类的病原相关分子模式，是免疫细胞在固有免疫反应中区分自我、非我的分子基础。模式识别受体或其信号转导分子功能的缺失，会导致免疫系统在病原入侵时不能有效地发生固有免疫反应，使宿主对病原的敏感性增高。模式识别受体或其信号途径的过度活化则造成过量的细胞因子等免疫活性物质的产生，使宿主组织、器官发生炎症等病理损伤，严重者可发生内毒素休克等病症。模式识别受体的活化还可以诱导抗原提呈细胞的成熟，促进获得性免疫反应的发生，调节获得性免疫反应的类型、程度。除了病原保守成分以外，模式识别受体还可识别一系列的宿主内源性配体，与自身免疫性疾病的发生有密切关系。

第二节　Toll 样受体的信号转导

一、Toll 样受体信号转导的主要途径及常用研究方法

TLR 是目前研究最多的模式识别受体。在小鼠细胞中已经发现了 12 个 TLR 家族成员基因，在人细胞中鉴定了 10 个 TLR 家族成员基因。TLR2 识别脂多肽、脂壁酸、阿拉伯甘聚糖等细菌壁成分；TLR3 识别病毒双链 RNA；TLR4 识别细菌壁脂多糖(LPS)；TLR5 识别细菌鞭毛素；TLR7、TLR8 识别病毒单链 RNA；TLR9 识别细菌 DNA 中 CpG 基序（表 11-2）。在感染过程中，这些病原成分会在宿主细胞内外不同的部位被释放或暴露。与此对应，TLR 家族成员在免疫细胞中有不同的细胞定位。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 主要表达在细胞膜表面，TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 表达在胞质内。但在识别病原相关分子模式的过程中，某些 TLR 分子的细胞定位可发生动态的变化。例如，TLR4 识别 LPS 后会从细胞表面转移到细胞内。TLR 细胞定位的变化与其信号转导功能相适应。TLR4 在细胞膜表面通过募集 MyD88 接头蛋白活化 MyD88 依赖的信号转导途径，在胞质内通过募集 TRIF 接头蛋白活化 TRIF 依赖的信号转导途径。TLR 分子的细胞定位可利用共聚焦显微技术进行检测。

表 11-2　TLR 的主要配体及其来源

受体	配体	配体来源
TLR1	三酰脂肽	细菌，分枝杆菌
TLR2	肽聚糖	革兰氏阳性菌
	胞壁酸	革兰氏阳性菌
	非典型的脂多糖（atypical LPS）	革兰氏阳性菌
	糖基醇磷脂	锥形虫
	脂蛋白	分枝杆菌
	酵母多糖	真菌
	热激蛋白 70	宿主
	高迁移率蛋白 B1	宿主
TLR3	双链 RNA	病毒
	poly I∶C	合成化合物
TLR4	脂多糖	革兰氏阴性菌
	紫杉醇	植物
	F 蛋白	呼吸道合胞病毒
	热激蛋白 60	宿主
	热激蛋白 70	宿主
	透明质酸的寡糖	宿主
	硫酸肝素的多糖成分	宿主

续表

受体	配体	配体来源
TLR4	纤粘连蛋白	宿主
	纤维蛋白原	宿主
	高迁移率蛋白 B1	宿主
TLR5	鞭毛	细菌
TLR6	二酰脂肽	支原体
	胞壁酸	革兰氏阳性菌
	酵母多糖	真菌
TLR7	咪唑喹啉	合成化合物
	洛索立宾	合成化合物
	单链 RNA	病毒
TLR8	咪唑喹啉	合成化合物
	单链 RNA	病毒
TLR9	CpG DNA	细菌或病毒
TLR10	未知	未知
TLR11（小鼠）	尿路致病菌来源蛋白	尿路致病菌
	肌动蛋白抑制蛋白 profilin 样蛋白	寄生虫

TLR 家族成员均为Ⅰ型跨膜蛋白。其外功能区有富含亮氨酸重复序列的结构域，形成马蹄形螺旋管状空间结构，是 TLR 识别配体的主要功能区。TLR 常以二聚体的形式识别配体。TLR2 分别与 TLR1、TLR6 形成异二聚体，识别细菌的三酰脂肽和二酰脂肽，TLR3、TLR4 形成同二聚体识别相应的配体（表 11-2）。利用 X 射线晶体衍射、核磁共振等技术可以研究 TLR 分子识别、结合配体并促发信号转导的空间结构基础。

TLR 对配体的识别可触发胞内功能区募集下游信号分子、介导信号转导。TLR 胞内功能区含有一个保守的具有信号转导功能的结构域，该结构域也存在于 IL-1 受体家族分子的胞内区，因而被称为 TLR/IL1R 结构域（TIR）。TIR 还存在于某些具有接头蛋白功能的信号分子中，如 MyD88、TRIF 等。通过 TIR 之间的相互作用，MyD88、TRIF 直接或间接地结合 TLR 胞内段，介导 TLR 信号转导。MyD88 是 TLR2、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9 共用的信号转导分子，TRIF 则介导 TLR3、TLR4 信号。此外，还有 Toll 样受体相关分子（Toll-like receptor associated molecular, TRAM）、Mal（MyD88-adaptor-like）等其他含有 TIR 的 TLR 信号分子。TLR 家族各成员除了结合 MyD88、TRIF 等共用的信号分子外，还可以特异性结合特有的信号分子，例如，TRAM 参与 TLR4 下游 TRIF 依赖的信号转导，但并不参与 TLR3 下游 TRIF 依赖的信号转导。这种特性使得 TLR 家族各成员在识别相应配体后会诱导相互重叠但却并不相同的信号转导，最终产生不同的生物学效应。例如，TLR 的活化可以影响获得性免疫反应的类型。TLR2、TLR9 均活化 MyD88 依赖的信号途径，TLR2 活化会促进 Th2 反应的发生，而 TLR9 活化会促进 Th1 反应的发生。TLR 及其信号转导分子间的相互作用常利用免疫沉淀、共聚焦显微镜等技术来研究（参见第二十三章蛋白

质间相互作用)。

TLR 的活化可导致其下游信号转导分子发生磷酸化、泛素化、乙酰化等多种蛋白质的修饰。例如，IRAK1 被 MyD88 分子募集后会发生磷酸化或自身磷酸化，随后被降解；TRAF6 在 IRAK1 下游，与 IRAK1 结合后发生泛素化，从而介导 TAK1 蛋白激酶的活化。所有的 TLR 家族成员的活化均能促进有丝分裂原激活的蛋白激酶（MAPK）以及转录因子核因子 κB（NF-κB）的活化，因此常通过检测 MAPK、NF-κB 的磷酸化来反映 TLR 信号通路的活化程度。上述 TLR 信号分子的蛋白质修饰大多数可利用已经商品化的特异性抗体进行蛋白质印迹检测（见第二十一章“蛋白质电泳和鉴定技术”）。转录因子在活化以后可以结合所调控的基因的启动子区，促进调控基因的表达。在 TLR 信号转导机制的研究中，也可以构建转录因子调节的荧光素酶报道基因表达载体，通过测定荧光素酶底物的发光度检测转录因子的活化程度（参见第二十八章“免疫细胞信号转导研究技术”）。

二、Toll 样受体信号分子功能研究的主要方法

研究特定分子在 TLR 信号转导中的作用，可以通过基因转染、RNA 干扰、基因敲除等技术改变其在细胞内的表达水平，然后观察其是否影响 TLR 配体刺激诱导的蛋白质分子的修饰，如磷酸化、泛素化、蛋白质降解等。细胞因子、Ⅰ型干扰素的产生是 TLR 信号转导最直接的生物学效应之一，可以利用 ELISA、定量 PCR 等技术进行检测（参见第十四章“免疫酶技术”、第十七章“定量 PCR”）。这些基因表达水平的变化可以反映 TLR 信号转导的改变。

我们以蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP-2 参与 TLR 信号调节的研究为例，简要介绍 TLR 反应中信号分子的功能研究的一般思路和方法。

除了 TLR3 以外的所有 TLR 家族成员都利用 MyD88 接头蛋白来活化免疫细胞，依次活化 IRAK1、TRAF6、TAK1，从而活化下游的 MAPK 和 NF-κB，介导炎性因子的产生。而在 TLR3 和 TLR4 信号转导中还存在 TRIF 依赖的 MyD88 非依赖的信号通路，通过 TRIF-TBK1 信号途径活化 IRF3 转录因子，介导Ⅰ型 IFN 的产生。

为了研究蛋白磷酸酶 SHP-2（Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2）在 TRIF 依赖的 TLR 信号转导中的作用，可以首先从细胞生物学功能方面着手，研究在巨噬细胞中 SHP-2 的蛋白质表达是否影响 TLR3 和 TLR4 的激动剂 poly I：C 和 LPS 诱导的Ⅰ型 IFN 的表达。通过合成并转染针对 SHP-2 的小干扰 RNA（siRNA）到小鼠原代腹腔巨噬细胞，检测内源性 SHP-2 蛋白的表达情况，观察到 siRNA对 SHP-2 蛋白表达的抑制作用。将上述细胞用 poly I：C 或 LPS 进行刺激，然后分别用 RT-PCR 和 ELISA 的方法检测细胞中 IFN-β mRNA 表达水平和培养上清中 IFN-β 蛋白表达水平，发现两者均显著升高，表明 SHP-2 抑制 TCR3、TCR4 介导的 IFN-β mRNA 和蛋白质的表达。

为了确定 SHP-2 对 TLR3 介导的 IFN-β 表达的抑制作用，利用 *SHP-2* 基因缺陷（$Ptpn11^{-/-}$）的小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）和野生型对照（$Ptpn11^{+/+}$ MEF）作为细胞模型，用 poly I：C 进行刺激以后，检测两种细胞株的 IFN-β mRNA 表达水平和蛋

白质表达水平，可以发现 Ptpn11$^{-/-}$ MEF 中 IFN-β mRNA 水平和蛋白质表达水平显著高于 Ptpn11$^{+/+}$ MEF 中 IFN-β mRNA 水平和蛋白质表达水平，进一步说明 SHP-2 具有抑制 TLR3 反应中 IFN-β 转录和蛋白质表达的功能。

在 TLR3 和 TLR4 介导的天然免疫反应中，Ⅰ型干扰素的产生是由 TRIF 信号途径介导的。在 293 细胞中，TRIF 信号分子的表达可诱导 IFN-β 荧光素酶报道基因的表达。因此，可以用 SHP-2 和 TRIF 表达质粒共转染 293 细胞，通过观察 SHP-2 表达是否影响 TRIF 诱导的 IFN-β 荧光素酶报道基因的表达，研究 SHP-2 对 TRIF 依赖的基因表达的影响。实验结果显示，SHP-2 表达抑制了 TRIF 诱导的 IFN-β 荧光素酶报道基因的表达。以上结果均表明 SHP-2 是 TRIF 信号途径的一个负向调控因子。

TRIF 在 TLR 信号转导过程中不仅介导Ⅰ型 IFN 的表达，也促进炎性细胞因子的表达，但对完全依赖于 MyD88 信号途径的 TLR2、TLR7、TLR9 介导的炎性细胞因子的表达没有显著影响。根据这一原理，对比 *SHP-2* 基因敲减和 *SHP-2* 基因敲除对 poly I∶C、LTA、R837、CpG ODN（分别为 TLR3、TLR2、TLR7、TLR9 激活剂）诱导的炎症因子 *TNF-α*、*IL6* 基因表达的影响，发现 *SHP-2* 基因敲减和 *SHP-2* 基因敲除只增高 poly I∶C 诱导的炎症因子 *TNF-α*、*IL6* 基因的表达，而对于 LTA、R837、CpG ODN 诱导的炎症因子 *TNF-α*、*IL6* 基因的表达无显著影响，提示 SHP-2 特异性抑制 TRIF 途径依赖的信号转导。

在 TLR3 和 TLR4 信号转导过程中，IRF3 是 TRIF 依赖途径介导Ⅰ型 IFN 表达的关键性转录因子。在细胞株中共转染 TRIF、SHP-2 表达质粒以及 IRF3 转录活性报道基因的表达质粒，通过检测 IRF3 转录活性报道基因的表达研究 SHP-2 表达对 IRF3 转录活性的影响，可以发现 *SHP-2* 过表达以剂量依赖的方式抑制 LPS 诱导的 IRF3 的转录活化。将 Ptpn11$^{+/+}$ MEF 和 Ptpn11$^{-/-}$ MEF 细胞转染入 IRF3 的报道基因质粒，再用 poly I∶C 进行刺激，检测 IRF3 转录活化的情况，可以发现 *SHP-2* 基因缺陷显著增加 poly I∶C 诱导 IRF3 的转录活化。这些实验不仅为 SHP-2 对 TRIF 途径的信号转导具有抑制作用提供了进一步的证据，而且从分子机制方面提示了 SHP-2 通过抑制 IRF3 的活化负向调节 TRIF 途径介导的Ⅰ型 IFN 产生。

TBK1 作为 TRIF 下游的信号分子，是 TRIF 诱导 IRF3 活化和Ⅰ型 IFN 表达所必需的分子。为了研究 SHP-2 是否抑制了 TBK1 活化的信号转导，在 Ptpn11$^{+/+}$ MEF 和 Ptpn11$^{-/-}$ MEF 中转染 TBK1 表达质粒和 IFN-β 报道基因质粒，结果显示，在 *SHP-2* 基因缺陷的细胞中，TBK1 活化的 *IFN-β* 报道基因的表达显著增加。

SHP-2 基因缺陷的 MEF（Ptpn11$^{-/-}$ MEF）中，poly I∶C 诱导的促炎性细胞因子表达增加，观察 *SHP-2* 基因缺陷对 TBK1 活化的 *TNF-α* 报道基因表达的影响，发现 *SHP-2* 基因缺陷可增加 TBK-1 诱导的 *TNF-α* 报道基因表达。在 Ptpn11$^{+/+}$ MEF 和 Ptpn11$^{-/-}$ MEF 中转染针对 TBK1 的干扰小 RNA，抑制 TBK1 蛋白的表达，研究 TBK1 表达对 poly I∶C 诱导的 IL-6 表达的影响。虽然在 Ptpn11$^{+/+}$ MEF 中，TBK1 敲减并没有影响 IL-6 的表达，但在 Ptpn11$^{-/-}$ MEF 中，TBK1 敲减却显著抑制了 poly I∶C 诱导的 IL-6 的表达。通过这些实验，我们可以得出一个结论，SHP-2 分子抑制 TBK1 介导的信号转导。

已有研究显示，SHP-2 的 463 位半胱氨酸突变成丝氨酸以后，其酪氨酸磷酸酶的活性受到抑制。为了研究 SHP-2 是否通过其磷酸酶的活性来抑制 TRIF 依赖的细胞因子的产生，可以在细胞系中表达野生型 SHP-2（SHP-2W）或者 SHP-2 463 位突变体（SHP-2CS），用 poly I∶C 对两种表达细胞进行刺激以后，再检测 TNF-α、IL-6 和 IFN-β 的表达情况，发现野生型 SHP-2（SHP-2W）或者 SHP-2 463 位突变体（SHP-2CS）蛋白质分子均能抑制 poly I∶C 诱导的 TNF-α、IL-6 和 IFN-β 的产生，表明 SHP-2 抑制 poly I∶C 诱导的细胞因子产生并不依赖于其磷酸酶活性。

现在需要回答的问题是，SHP-2 通过怎样的分子机制来负向调节 TBK1 活化的信号转导和基因表达呢？首先用免疫共沉淀的方法检测 TLR 信号转导过程中内源性的 SHP-2 是否结合 TBK1。在经过 poly I∶C 刺激以后，用 SHP-2 的特异性抗体沉淀 Raw264.7 巨噬细胞的 SHP-2 蛋白质复合体，检测 TBK1 是否存在于复合体中。实验表明，TLR3 信号活化以后，内源性的 SHP-2 能够与 TBK1 结合，形成蛋白质复合体。

在 TLR3 信号通路中，TBK1 是 TRIF 下游的一个必需的信号分子。有文献表明，TBK1 分子 N 端 K38A 突变后阻断了其与 TRIF 的结合，表明了 TBK1-TRIF 相互结合需要 TBK1 的激酶活性。构建 TBK1 K38A 突变体质粒，并与 SHP-2 质粒一起在 HEK 293 细胞中共表达。免疫共沉淀实验表明，TBK1 K38A 突变对 TBK1 与 SHP-2 的相互结合没有显著影响，间接地提示了 TBK1 和 SHP-2 的结合并不依赖于 TRIF-TBK1 蛋白质复合体的形成。

体外重组蛋白 pull-down assay 常被用于研究蛋白质分子间的结合。将纯化后的大肠杆菌表达的 TBK1 重组蛋白与带 GST 标签的 SHP-2 重组蛋白共孵育，然后用谷胱甘肽-琼脂糖结合 GST 融合蛋白复合体，再用 TBK1 的抗体检测 GST 融合蛋白复合体中 TBK1 的存在，为 TBK1 和 SHP-2 的结合提供了证据。在生化实验中，通过观察 SHP2 对 TBK1 蛋白激酶介导的底物磷酸化的影响，发现 SHP-2 的存在显著抑制了 TBK1 蛋白激酶介导的底物磷酸化，提示 SHP-2 可以直接结合 TBK1 并抑制 TBK1 介导的下游信号分子的磷酸化，说明 SHP-2 抑制 TLR3 和 TLR4 反应中 TRIF、TBK1 介导的信号转导和基因表达的分子机制。

TLR 的识别及其信号转导的分子机制是近年来免疫学研究的热点之一。越来越多的证据表明，TLR 的信号转导受到非常精细的调节以维持机体免疫稳定。TLR 信号转导精细的调节机制仍有待进一步阐明。

（安华章　郑月娟）

参考文献

An H, Zhao W, Hou J, et al. 2006. SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. Immunity, 25 (6), 919～928.

An HZ, Qian C, Cao XT. 2010. Regulation of toll-like receptor signaling in the innate immunity. Sci China Life Sci, 53 (1), 34～43.

第十二章　免疫荧光技术

免疫标记技术是在抗原抗体特异性结合的基础上，将某种可测定的物质（如放射性核素、荧光素、酶、化学发光剂等）偶联到抗原（抗体）上制成示踪剂，加入到抗原-抗体的反应体系中与相应的抗体（抗原）反应，通过检测标记物的有无和含量对样品中待检抗原或抗体进行的定性、定量以及定位的一种检测方法。近三十几年来，免疫标记技术和检测方法有了长足的发展，酶、荧光素、放射性核素、化学发光剂等标记物的发展使检测的敏感性和特异性都大大提高。虽然 20 世纪 50 年代异硫氰酸荧光素最先使免疫荧光检测（immunofluorescence assay，IFA）得到发展，但 80 年代以来多种更灵敏和化学性质更稳定的新型荧光物质的发展使得这一技术依然长盛不衰，在临床、科研以及其他多种领域都有广泛的应用，放射免疫（radio immunoassay，RIA）在 20 世纪 60 年代兴起，而酶标记物建立于 20 世纪 70 年代，化学发光技术兴起于 20 世纪 80 年代。这些将标记技术与抗原抗体反应相结合的免疫学检测技术以其敏感性高、准确性好、易于操作、具有商品化和自动化等特点替代了经典的凝集试验、沉淀试验等免疫学检验方法，是目前应用最为广泛的免疫学检测技术。到目前为止，免疫荧光技术可以说是临床医学检验中应用最为广泛的一门技术。除此之外，也应用于科研、食品分析、环境监测、毒品检验等多个领域。用于鉴定的材料也很多，可以是血清（体液）、培养物、组织、分泌排泄物，也可以是土壤、水等。然而，无论采用何种标记物，对标记物的要求原则是标记物与抗体或抗原偶联后不能改变后者的免疫学特性，并且也不能严重影响自身的灵敏度、稳定性及可测性等理化性质。

第一节　概　　述

免疫荧光技术（immunofluorescence technique）又称荧光抗体技术，根据抗原抗体反应的原理，将荧光素偶联到已知的抗原或抗体上制成荧光探针，与血清或体液、细胞、组织中存在的相应抗体（或抗原）结合，从而对这些组织中存在的抗原或抗体进行定性、定量和（或）定位的检测。免疫荧光技术以抗原抗体的特异性结合为立足之本；有机化学的发展为标记物的合成以及将其偶联于抗原/抗体提供了技术支持；而显微镜、流式细胞仪、荧光偏振仪、时间分辨检测仪等仪器设备的发展为检测标记物提供了更为快速、准确、操作方便，以及大规模高通量的检测手段。免疫荧光技术包括荧光抗体法、荧光抗原法和免疫荧光细胞/组织化学技术。荧光抗体法指用荧光抗体示踪或检测液相中的相应抗原；荧光抗原法指用已知荧光抗原示踪或检测液相中的相应抗体；免疫荧光细胞/组织化学技术指用免疫荧光技术显示和检查细胞或组织内抗原性物质或者抗体。虽然免疫荧光技术具有特异性强、敏感性高、速度快等优势，但一些待测样品本身

具有的自发荧光本底，染色过程中带来的非特异性染色以及进行两种以上荧光标记时的“串色”等问题，会导致结果判定的客观性不足。但是，近年来发展了几种特殊的荧光免疫测定技术，大大减少了这些问题，使得免疫荧光技术在临床实验诊断等领域得到了广泛的应用。

第二节　免疫荧光技术的基本原理

一、抗原-抗体反应

由于抗原-抗体反应具有高度的特异性，所以只要知道其中的一个因素，就可以查出另一个因素。免疫荧光技术就是借助了抗原-抗体特异性结合的基本原理，将不影响抗原/抗体活性的荧光染料标记在抗体/抗原上，作为探针与其相应的抗原/抗体结合，在特定波长激发光下，发射出一定波长的发射光，通过接受装置直接传递到检测者，或者转变为数字信号通过计算机系统整合给出结果。

二、荧光的产生原理

物质原子外的电子可以具有多个能级，能量最低的是基态。当光子能量恰等于两个能级的能量差时，电子会吸收光子的能量跃迁到高能级的激发态。然而电子在激发态的状态极不稳定，会立即向低能级跃迁。当某个激发态与基态间有多个能级时，就可以因回到的能级不同而发出不同能量的光子，当其中的光子对应的是可见光的光子能量时，就发出了可见光。荧光物质发出的可见光光子能量肯定不会比其吸收的光子能量大。荧光物质常常可被紫外线激发发出可见光，这是因为紫外线的能量比可见光的能量大。当荧光物质受到紫外线照射时，其电子吸收紫外线的光子而被激发跃迁至激发态，当其向基态跃迁时，由于其激发态与基态间还有其他能级，所以此时释放的光子能量就低于紫外线的能量，而刚好处在可见光的范围之内，即产生所谓的荧光。

荧光发射的特点是：荧光物质在接受能量后即刻产生荧光；而一旦停止供能，荧光现象随之消失。由光激发所引起的荧光称为致荧光，由化学反应所引起的称为化学荧光，由 X 射线或阴极射线引起的分别称为 X 射线荧光或阴极射线荧光。

三、荧光效率和影响荧光效率的因素

1. 荧光效率

荧光分子不会将全部吸收的光能都转变成荧光，总或多或少地以其他形式释放。荧光效率指荧光分子将吸收的光能转变成荧光的百分率，与发射荧光光量子的数值成正比，即荧光效率＝发射荧光的光量分子数（荧光强度）/吸收光的光量子数（激发光强度）。

2. 影响荧光效率的因素

发射荧光的光量子数即荧光强度，与激发光强度和激发光波长有关。每种荧光物质

有其特定的吸收光谱和发射光谱（荧光光谱），即在某一特定波长处有最大吸收峰和最大发射峰。选择激发光波长量接近荧光分子的最大吸收峰波长，且测定光波量接近最大发射光波峰时，得到的荧光强度也最大。例如，FITC 的最大吸收峰为 495nm，最大发射峰为 519nm，因此在进行流式细胞仪或者共聚焦显微镜检测 FITC 作为标记物的分子情况时，需要选择 488nm 的激光器，接收器在流式细胞仪选择 FL1 通道（530/30nm），在共聚焦显微镜选择涵盖 519nm 的区域。

3. 荧光的淬灭

荧光物质在持续受到激发光或其他致荧光物质的作用后，产生荧光的能力会减弱甚至淬灭，这是由于激发态分子的电子不能回复到基态，所吸收的能量无法以荧光的形式发射。一些化合物有天然的荧光淬灭作用而被用作淬灭剂，以消除不需要的荧光。因此荧光物质应避光保存（尤其是紫外线），以及避免与其他具有淬灭作用的化合物接触。但有些时候，在免疫荧光技术中常用一些淬灭剂以减弱样品的非特异性荧光本底，使特异荧光更加明显。

第三节　免疫荧光的基本技术

一、抗体的选择

用于荧光标记的抗体，应该遵循以下几个原则：特异性强、高纯度、效价满意（>1∶20），最好采用单克隆抗体。

二、荧光素的选择

用于抗体标记的荧光素需要具备以下条件：能够与蛋白质形成稳定的共价键；标记后不影响蛋白质和自身的生物学活性；荧光效率高，标记后荧光强度下降不明显；荧光色泽与背景色泽对比鲜明；标记方法简单、快速；安全无毒。

三、荧光素的种类

（一）异硫氰酸荧光素

异硫氰酸荧光素（fluoresceinisothiocyanate，FITC）为黄色或橙黄色结晶粉末，易溶于水或乙醇等溶剂。相对分子质量为 389.4，最大吸收光波长为 490～495nm，最大发射光波长为 520～530nm，外观呈黄绿色。FITC 有两种同分异构体，Ⅰ型异构体在荧光效率、化学稳定性、与蛋白质结合能力等方面均优于Ⅱ型异构体。其在冷暗干燥处可保存多年，室温下也可以保存两年以上，因此是应用最广泛的荧光素。FITC 与抗体结合的原理是，在碱性条件下，FITC 的异硫氰基（—N═C═S）与抗体的游离氨基（主要是赖氨酸的 ε 氨基）经碳酰胺化而形成稳定的硫碳氨基键。理论上，一个 IgG 分子可以结合 80 余个 FITC 分子，但实际上一个 IgG 分子最多可以标记 15～20 个 FITC 分子，一般情况下只结合 2～8 个 FITC 分子。FITC 的结构式及其与蛋白质偶联

的反应式如图 12-1 所示。

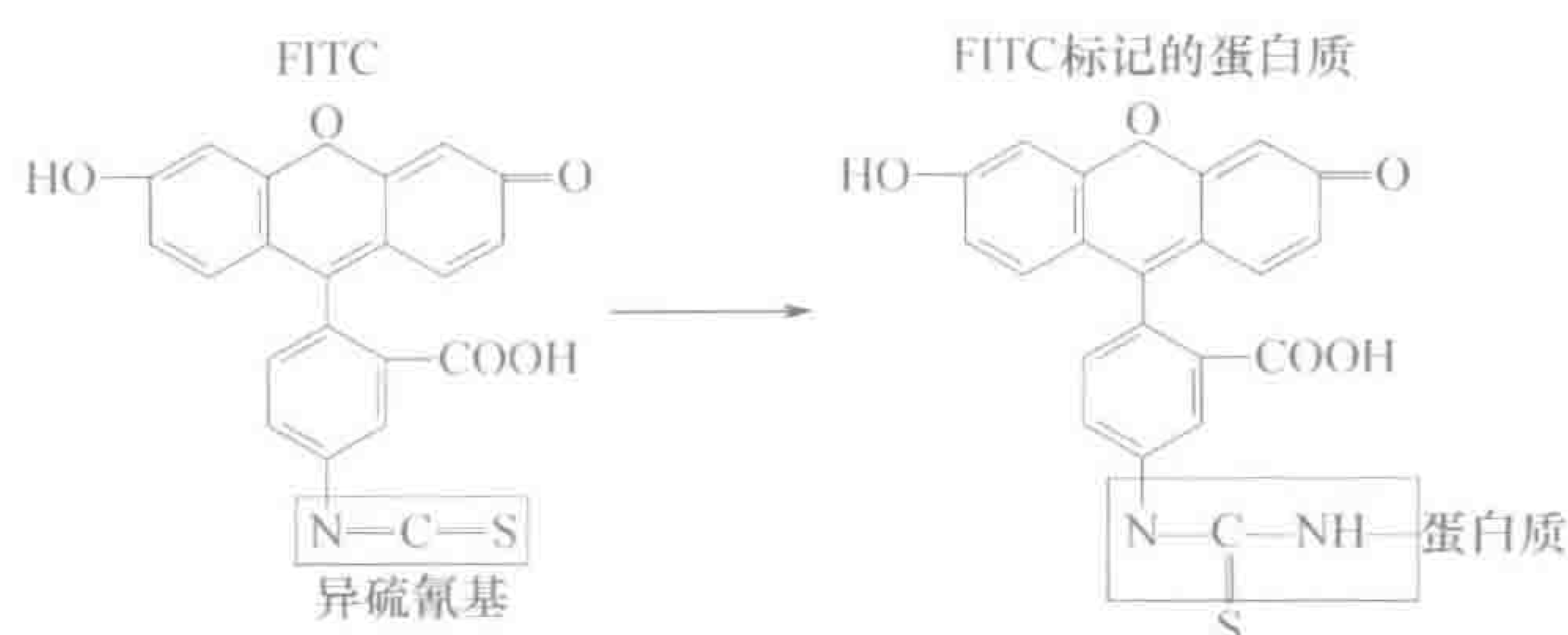


图 12-1　FITC 的结构式及其与蛋白质偶联的反应式

（二）四乙基罗丹明

四乙基罗丹明（rhodamine，RB200）为橘红色粉末，不溶于水，易溶于乙醇和丙酮。相对分子质量为 580，最大吸收光波长为 570nm，最大发射光波长为 595～600nm，外观呈橘红色荧光。理化性质稳定，可长期保存。RB200 在五氯化磷（PCl_5）作用下转变成磺酰氯（SO_2Cl），在碱性条件下，易与蛋白质的赖氨酸 ε 氨基反应而标记在蛋白质分子上。RB200 的结构式及其与蛋白质偶联的反应式如图 12-2 所示。

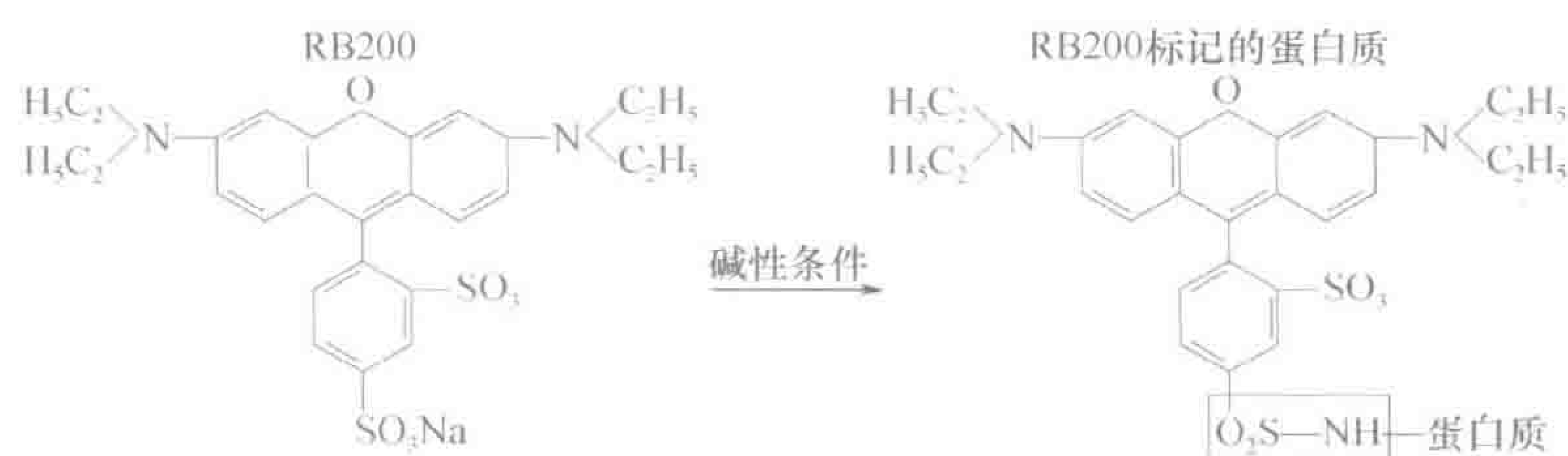


图 12-2　RB200 的结构式及其与蛋白质偶联的反应式

（三）四甲基异硫氰酸罗丹明

四甲基异硫氰酸罗丹明（tetramethylrhodamineisothiocyanate，TRITC）为 RB200 的衍生物，紫红色粉末，相对分子质量为 444，最大吸收光波长为 550nm，最大发射光波长为 620nm，呈橙红色荧光。TRITC 的橙红色与 FITC 的绿色荧光对比鲜明，可进行双重标记。同 FITC 一样，TRITC 分子中的异硫氰基（—N＝C＝S）与抗体的游离氨基（主要是赖氨酸的 ε-氨基）经碳酰胺化而形成稳定的硫碳氨基键，成为荧光素标记抗体。TRITC 的结构式及其与蛋白质偶联的反应式如图 12-3 所示。

（四）其他经典荧光素

表 12-1 列出了其他经典荧光素，这些荧光素多数可以在流式细胞仪和显微镜分析检测中应用。

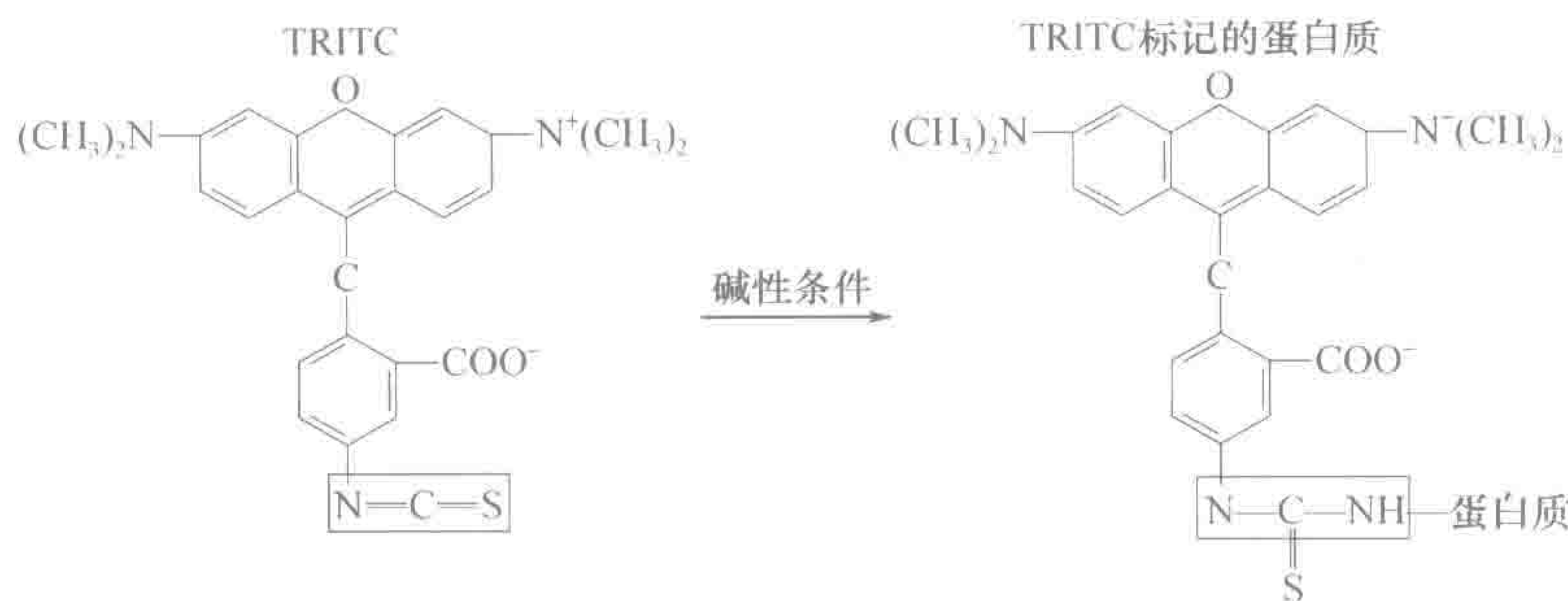


图 12-3　TRITC 的结构式及其与蛋白质偶联的反应式

表 12-1　经典荧光素的最大激发波长和最大发射波长

荧光素	最大激发波长/nm	最大发射波长/nm
DAPI	359	461
7-AAD	546	647
PI	305～540	620
Alexa405	401	421
Alexa488	495	519
PE	496～565	575
PE-Texas Red	565	613
PE-CY5	565	670
PerCP	482	670
PE-CY5.5	565	690
PerCP-CY5.5	482	690
PE-CY7	495～565	770
APC	650	660
Alexa647	650	660
CY5	649	666
APC-CY5.5	650	690
APC-CY7	650	770

注：DAPI（4′,6-diamidino-2-phenylindole），4′,6-二脒基-2-苯基吲哚；7-AAD（7-amino-actinomycin D），7 氨基放线菌素 D；PI（propidium iodide），碘化丙啶；PE（phycoerythrin），藻红蛋白；CY（cyanine），花青素；PerCP（peridinin），绿叶素蛋白质；APC（allophycocyanin ），别藻蓝蛋白。

（五）酶作用后产生荧光的物质

某些化合物本身无荧光效应，但是经酶作用后可以产生荧光现象，如 4-甲基伞酮-β-D 半乳糖苷在 β-半乳糖苷酶的作用后分解成 4-甲基伞酮，后者可发出荧光，最大激发光波长为 360nm，最大发射光波长为 450nm。此外，还包括碱性酸酶的底物 4-甲基伞酮磷酸盐和辣根过氧化物酶的底物对羟基苯乙酸等。

（六）镧系螯合物

某些3价稀土镧系元素如铕（Eu^{3+}）、铽（Tb^{3+}）、铈（Ce^{3+}）等的螯合物经激发后可发射特征性的荧光。镧系螯合物具有以下特点：激发光最大波长和发射光最大波长之间的位移达200nm之宽，可以排除激发光的干扰；镧系元素离子螯合物荧光的衰变时间长，为经典荧光物质的10^3～10^6倍；镧系元素螯合物的激发光光谱较宽，最大激发光波长为300～500nm，因此可通过增加激发光能量来提高灵敏度；镧系元素螯合物的发射光谱很窄，不到10nm，因此通过选用合适的滤光片，可有效降低本底荧光；镧系元素螯合物的标记物体积很小（为原子标记），不会影响被标记物的空间构象，还可实现多位点标记，提高荧光效率；镧系元素螯合物的理化性质很稳定，可以长期保存。

四、荧光素标记抗体的方法

（一）FITC标记抗体方法

现在常用的FITC标记抗体的方法为Marsshall法，也可以采用Chadwick或Clark等的透析标记法。下面简单介绍Marsshall法和Chadwick法的主要流程。

Marsshall法

材料与试剂

抗体溶液
0.5mol/L（pH9.0）碳酸盐缓冲液
生理盐水
FITC
1%硫柳汞水溶液
搅拌器
透析袋
pH7.2的0.01mol/L PBS等

步骤

1）抗体的准备：取适量已知浓度的Ig溶液，加入生理盐水及碳酸盐缓冲液，调整其终浓度为20mg/ml，碳酸盐缓冲液容量为总体积的1/10，混匀，置搅拌器上搅拌（速度适当，以不起泡沫为宜）5～10min。
2）荧光素的准备：可以按每毫克Ig加0.01mg荧光素准备。
3）标记：边搅拌边将荧光素缓慢加入抗体溶液中，加完后，继续避光搅拌12h左右。标记过程应保持溶液在4℃左右。
4）透析：标记完毕后，将标记抗体溶液离心，除去沉淀物。然后将溶液装入透析袋中，用pH7.2的缓冲盐水透析，0～4℃过夜。
5）纯化：将透析后的抗体溶液通过葡聚糖凝胶Sephadex G-25或G-50柱，去除游离荧光素，将洗脱下来的荧光标记抗体进行鉴定，然后分装保存。

Chadwick 法

材料与试剂

FITC，抗体溶液，3%碳酸钠水溶液，1%硫柳汞，0.01mol/L（pH8.0）PBS，搅拌器，透析袋等

步骤

1）抗体的准备：取适量抗体溶液，用0～4℃、pH8.0的磷酸盐缓冲液稀释至浓度为30～40mg/ml，保持在0～4℃。

2）荧光素的准备：按每毫克抗体加入荧光素0.01mg计算所需的荧光素，溶于3%碳酸钠水溶液。

3）将抗体与荧光素溶液等体积混合，充分搅匀，在0～4℃中结合18～24h，期间在搅拌机上持续搅拌。

4）透析和纯化：方法同Marsshall法。

（二）RB200标记抗体方法

1）抗体准备：取抗体（20mg/ml），每毫升加入生理盐水和0.5mol/L（pH9.0）的碳酸盐缓冲液各1ml稀释。

2）荧光素的准备：取1g RB200及PCl_5 2g放在乳钵中研磨5min（在通风橱中操作）。然后加入10ml无水丙酮，放置5min，不断搅拌，过滤，用滤液进行抗体的标记。

3）标记：逐滴加入0.1ml RB200溶液，边加边搅拌。

4）透析：水透析5～7h。

5）纯化：经葡聚糖凝胶G50柱层析，除去游离荧光素，在0～4℃中结合2～18h，再用生理盐水分装，储存于0～4℃。

（三）TRITC标记抗体方法

1）抗体的准备：取IgG 10ml（6mg/ml），在0.1moL/L（pH9.5）碳酸盐缓冲液中透析过夜。

2）将TRITC（每毫克IgG加入5～20g）溶于二甲基亚砜（1mg/ml），取此溶液300ml，一滴一滴加入蛋白质溶液中，同时电磁搅拌。

3）在室温中避光搅拌2h。

4）纯化：Bio-Gel P-6层析柱，用0.01mol/L pH8.0的PBS平衡过滤，流速为1.5ml/min。

5）收集先流出的红色结合物，即为标记抗体，分装，4℃保存备用。

（四）镧系元素离子标记技术

由于稀土离子为金属离子，很难直接与抗原或抗体结合，在制备标记物时需要有一种双功能基团的螯合剂，分子内或带氨基和羧基或带有异硫氰酸基和羧酸基，其作用是

一侧基团与稀土离子连接，另一侧与抗体（抗原）上的游离氨基连接。对螯合剂的要求是标记率高、产物稳定、亲和性强、方法简单、价格便宜。目前常用的螯合剂有 *N*-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺-*N*1，*N*2，*N*3-四乙酸、氨基苯基-EDTA、氨基苯基-四氮杂环十二烷四乙酸、异硫氰酸苯甲基-DATT、1-(*p*-苯双氮)-EDTA、二乙烯三胺五乙酸酐（DTPPA）、异硫氰酸苯基-EDTA、β-萘甲酰三氟丙酮（β-NTA）、W1174 及（4,7)-双（氯化苯酚磺酸盐)-1，10 菲洛林（BCPDA）。标记效率依赖于蛋白质表面的游离氨基数目及其等电点。一般情况下游离氨基数目越大，等电点越高，蛋白质易与螯合剂反应，从而产生较高的标记率。标记率依赖反应体系的 pH、温度和时间，标记条件以 pH9.0～9.3 的标记结合率最高，反应时间以 14～24h，温度以（10±2)℃为宜。

五、荧光抗体的保存

荧光抗体的保存原则是：防止抗体失活；保持荧光素不脱落和不淬灭。一般荧光标记的抗体，在保存前加防腐剂（浓度为 0.01%的硫柳汞或 0.1%叠氮化钠）。制备好的荧光标记抗体一般在 0～4℃避光的条件下可保存 1～2 年，－20℃可保存 3～4 年。储存前需将制备好的或者购买的商品化荧光抗体小量分装，防止反复冻融。冷冻干燥的荧光抗体可以保存更长时间。

六、免疫荧光技术的染色方法

免疫荧光技术的染色方法分为直接法和间接法。直接法的原理是将荧光标记的抗原/抗体直接与相应抗体/抗原反应（图 12-4），多用于流式细胞仪分析。直接法的优点是操作简便、特异性高，非特异性荧光染色少。但直接法的灵敏度偏低，而且每检查一种抗原就需要制备一种荧光抗体，若检测多种抗原需制备多种相应的荧光标记抗体。间接法的原理是先用未标记的抗体（一抗）进行标记，使抗原抗体充分结合，然后洗涤，除去未结合的抗体；然后加上荧光标记的二抗，使之与已经结合在抗原上的一抗结合。如果第一步发生了抗原抗体反应，荧光标记的二抗就会和已结合抗原的抗体进一步结合，达到检测待测抗原的目的。有些时候，一抗为偶联生物素的抗体，而二抗实质为荧光偶联的链亲和素，因为生物素和链亲和素的高度特异性结合，可以大大减少非特异性染色背景。下面介绍这两种方法的主要操作流程。

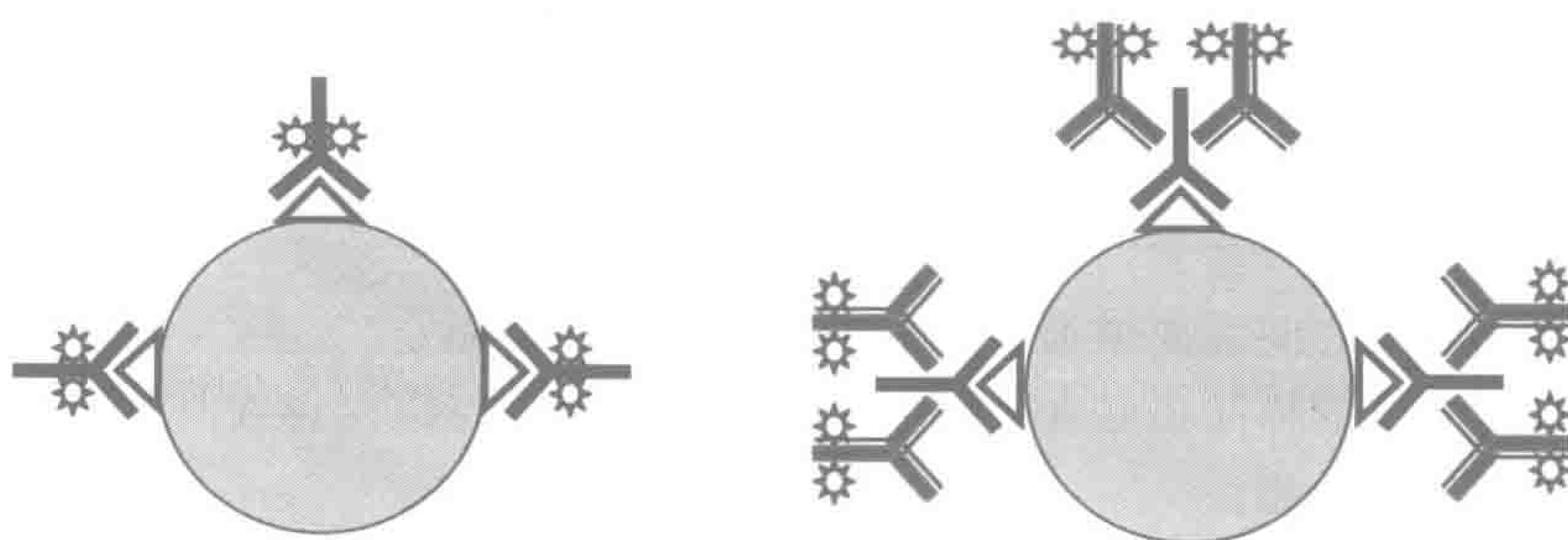


图 12-4　免疫荧光染色直接法和间接法的原理

（一）直接免疫荧光法

0.01mol/L PBS（pH7.2～7.4）
4% 多聚甲醛（4g 多聚甲醛溶于 0.01mol/L PBS 至 100ml）
Triton X-100
Saponin
BSA
荧光偶联抗体
玻片
Eppendorf 管
离心机（水平）
流式细胞仪

步骤

1）标本的处理：多数用于流式细胞仪检测的细胞样品常常是标记后即行检测，因此不需要固定，但是用于显微镜观察或者流式细胞仪进行胞内染色等样品，需要先将样品固定。流式细胞仪样品需要在固定前制备成单细胞悬液，与等体积4%的 PBS-多聚甲醛混合，室温固定 10～15min；细胞涂片、细胞爬片等样品浸入冷丙酮或 2% 的多聚甲醛中固定 10min；然后用 0.01mol/L PBST（含0.1% Triton X-100，pH7.4）或者含有 0.1% Saponin 的 0.01mol/L PBS 漂洗3 遍；石蜡切片经脱蜡、梯度乙醇脱水后，进行抗原修复，然后用 0.01mol/L PBST 漂洗 3 遍。

2）封闭：用含 2%～10%BSA（或者抗体来源血清）37℃湿盒内封闭 30min。

3）染色：在标本上滴加或重悬于适当浓度的稀释荧光标记抗体（终浓度为1～5μg/ml，或者预先滴定好浓度）溶液中，放在湿盒中，37℃孵育 15～30min；或者 0～4℃ 1h。

4）洗涤：用 0.01mol/L 的 PBS（pH7.2～7.4）洗涤 3 遍，去除多余的游离荧光抗体。

5）缓冲甘油封片，镜检；或者用 0.01mol/L 的 PBS（pH7.4）300μl 重悬细胞，过滤团块，流式细胞仪检测。

注意事项

1）荧光抗体的稀释常常需要预先滴定，选择最佳的染色浓度。

2）染色温度和时间需要根据标本种类及待检的抗原而定。

3）流式细胞仪的样品最好立即检测，固定后的样品可以保存在 0～4℃，但保存时间不要超过一周。

4）直接法需要设置下列对照：自发荧光对照（空白对照，不加荧光抗体，其余步骤同）、阳性对照（已知的阳性标本进行相同的染色过程）、特异性对照（标本先加未标记的特异性抗体，然后再加荧光标记的特异性抗体，其余步骤同）。若

标本自发荧光对照和特异性对照呈无荧光或弱荧光，阳性对照和待检标本呈强荧光，则为特异性阳性染色。

（二）间接免疫荧光法

0.01mol/L PBS（pH 7.2～7.4）
4%多聚甲醛（4g 多聚甲醛溶于 0.01mol/L PBS 至 100ml）
Triton X-100
Saponin
BSA
荧光偶联抗体
一抗
荧光偶联二抗
玻片
Eppendorf 管
离心机（水平）
流式细胞仪

步骤

1）样本的处理：同直接法。
2）封闭：同直接法。
3）一抗染色：用未标记荧光素的抗体进行，操作步骤同直接法。
4）洗涤：用 0.01mol/L 的 PBS（pH 7.4）洗涤 3 遍，去除多余的未标记抗体（一抗）。
5）二抗染色：在标本上滴加或重悬于适当稀释的荧光标记二抗（1～5μg/ml，或者预先滴定好浓度）溶液中，放在湿盒中，37℃孵育 15～30min；或者 0～4℃ 1h。
6）洗涤：用 0.01mol/L 的 PBS（pH7.2～7.4）洗涤 3 遍，去除多余的游离荧光抗体。
7）缓冲甘油封片，镜检；或者用 0.01mol/L 的 PBS（pH7.2～7.4）300μl 重悬细胞，过滤团块，流式细胞仪检测。

注意事项

1）荧光抗体的浓度、染色时间和温度需要预先滴定，选取最佳条件。
2）间接免疫荧光法需要设置以下 3 种对照：阴性对照（与一抗同型的无关抗体＋荧光二抗，其余步骤同）；阳性对照（阳性标本进行同样的标记步骤）；荧光标记物对照（PBS＋荧光标记二抗，其余步骤同）。

第四节　免疫荧光的分析和检测技术

免疫荧光的分析和检测根据待测样品类型和对待测物含量的要求需要不同种类的仪

器，包括荧光显微镜、（显微）荧光分光光度计、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪、荧光偏振免疫分析仪或者时间分辨荧光计等仪器，对体系中的荧光标记物或其结合产物进行定性、定量或者定位的分析。激光共聚焦显微镜分析和检测技术在第二十九章有详细介绍，流式细胞仪分析和检测技术在第二十五章进行详细介绍，本章仅介绍荧光偏振技术和时间分辨荧光免疫测定技术及其应用。

一、荧光偏振免疫分析

（一）基本原理

荧光偏振免疫分析（fluorescence polarization immunoassay，FPIA）的基本原理是带有荧光的分子经单一波长的偏振光照射后，发射出相应的偏振荧光，其强度与荧光分子的大小呈正相关，由此建立一种定量分析技术。荧光标记的小分子质量抗原在溶液中旋转速度快，偏振荧光强度小。但是，当荧光标记的小分子抗原与其相应抗体结合后，形成的大分子在溶液中旋转速度变慢，偏振荧光强度随之增高。利用荧光标记抗原和其抗原抗体结合物之间偏振荧光强度的差异，用竞争性方法可以测量溶液中小分子质量抗原的含量。例如，将荧光标记的小分子药物、待测样品及该小分子药物的抗体三者混合，若待测样品中含有未标记的小分子药物，其浓度越低，则标记的小分子药物与抗体结合得就越多，形成大体积的荧光标记小分子药物与抗体的结合物就越多，旋转速度减慢，偏振荧光强度就越高；反之，偏振荧光强度就越低。通过荧光标记药物的浓度与对应的荧光偏振值做标准曲线，即可进行定量分析。因此，FPIA 是用于测定液相中抗原的一种定量方法，常用于测定半抗原的药物浓度。

（二）应用

目前 FIPA 在临床上常用于对血清中药物和小分子质量激素，如卡马西平、苯巴比妥、丙米嗪、地高辛、环孢菌素、苯妥英钠、庆大霉素、同型半胱氨酸、甲状腺素、黄体酮等进行检测；在毒品检验中，用于血液和尿液中可卡因及其代谢物、安非他命及其代谢物等的测定；还在环境监测中，用于对农药及其他生物毒性物质的检测和分析。

FIPA 作为一种均相标记免疫分析技术，具有以下优点：操作简便，省却了固相标记过程中反复多次的洗涤步骤，样品中可以同时加入荧光示踪物和抗体，易于实现自动化控制；快速，数分钟甚至数秒钟内即可完成测定，有利于大批量样品的分析测试；不易受到样品背景的干扰；FIPA 的主要局限性在于：局限于小分子质量物质的测定；灵敏度较低，能检出的分子质量限为 0.1～10ng。

二、时间分辨荧光免疫分析

时间分辨荧光免疫分析（time-resolved fluoroimmunoassay，TRFIA）技术采用的是镧系元素离子作为荧光染料。经典荧光染料激发光和发射光波长的峰值位移小，激发光谱和发射光谱常有部分重叠，故测量荧光强度时不可避免地会相互干扰。并且，血清样品及其他样品常有非特异性荧光物质的干扰，如血色素、胆红素、细胞色素等存在，

严重影响了检测的灵敏度和准确性。镧系元素离子荧光光谱的最大特征是位移大，超过200nm，相互之间不会产生干扰。此外，镧系元素的灵敏度非常高，稳定性好，低温条件可保存3年，因而TRFIA技术成为21世纪最热门的免疫分析技术。到目前为止，镧系元素中的铕（europium，Eu）、铽（terbium，Tb）、钐（samarium，Sm）、钕（neodymium，Nd）、镝（dysprosium，Dy）5种元素被用作TRFIA示踪剂，尤以Eu^{3+}常用。

（一）基本原理

在游离状态下，镧系元素离子的荧光信号很弱，但是当配位形成聚合物时，发生分子内和分子间的能量传递，相互激发，极大地增强了荧光强度。镧系离子螯合物经紫外光激发后不仅荧光强度高，而且半衰期长，比普通的荧光物质半衰期长5或6个数量级，因而可用时间分辨荧光检测仪在激发后延迟一定时间后再测量，有效避免了非特异性荧光的干扰。同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨，可有效排除非特异荧光的干扰，极大地提高了分析灵敏度。TRFIA技术体系的基础试剂包括示踪剂、稀有元素双功能螯合剂、分析缓冲液、增强溶液。示踪剂标记蛋白质技术原理已如前所述，在进行TRFIA测定时，还需要加入增强溶液，这是因为镧系元素离子标记物在免疫反应后所形成的复合物在弱碱性缓冲液中被水淬灭，这样使得经紫外光激发所产生的荧光信号很弱，因此在测定前需要加入一种增强液。增强液一般由β-二酮体、三辛基氧化磷（TOPO）、Triton X-100、乙酸和邻苯二甲酸氢钾（pH2.0～3.2）组成。酸性增强液使镧系元素离子从螯合物中解离下来，游离的镧系元素离子在三辛基氧化磷的协同下，重新与β-二酮体形成一种新的能够高效率地接受激发光的螯合物。在激发光激发下，可发射极强的荧光信号。

（二）方法类型

双位点夹心法

双位点夹心法主要用于测定蛋白质类大分子化合物。将待测物上针对不同抗原决定簇的两个单克隆抗体，一个包被于固相载体，另一个用Eu^{3+}标记。标准品或待测物先与固相抗体发生免疫反应形成免疫复合物后，经洗涤后再加入Eu^{3+}标记抗体，生成Eu^{3+}标记抗体-抗原-固相抗体复合物，再次孵育，充分洗涤后加入增强液，将Eu^{3+}从复合物上完全解离下来，使Eu^{3+}与另一种螯合剂结合，在协同剂的作用下，形成新的螯合物。它在激发光作用下能发射出很强的荧光信号，所测得荧光强度与待测物的浓度成正比。下面简要介绍该法测定AFP的流程。

材料与试剂

分析缓冲液：0.1mol/L、pH7.5 Tris-HCl缓冲液，其中含0.3mol/L三氯乙酸钠，0.1% BSA，0.02% NaN3

洗涤液：生理盐水，含0.1%Tween20

荧光增强液：b-萘酰三氟丙酮6mg，三辛基磷化氢的氧化物19.33g，邻苯二甲酸氢甲1.3g，冰乙酸6ml，Tween20 0.2ml，加三蒸水至500ml，再加TritonX-

100 1ml，置37℃水浴至溶解后，补加三蒸水至1000ml，于塑料瓶内保存备用

抗AFP多抗

AFP标准品

Eu^{3+}标记的链亲和素

0.1mol/L pH9.6碳酸盐缓冲液

步骤

1）包被：用0.1mol/L、pH9.6碳酸盐缓冲液将抗AFP抗体稀释到10mg/ml，加入聚苯乙烯滴定条孔中，每孔100μl，室温放置20h。

2）甩弃包被液，用洗涤液洗3次。

3）加样：加入不同稀释度的AFP标准品及待检血清，加入缓冲液反应2～4h。

4）加入检测抗体：洗涤后，加入生物素化抗人AFP单抗，振荡温育反应1～2h。

5）洗涤后，加入分析液稀释的Eu^{3+}标记链亲和素，振荡反应1h。

6）洗涤后，加入增强液，快速振荡15min。

7）用时间分辨荧光仪测定荧光强度，以不同稀释度的AFP标准品为横坐标，以相应的荧光强度为纵坐标绘制标准曲线，从标准曲线上得到样品中待测样品中AFP的相应含量。

固相抗原竞争法

将大分子抗原或半抗原直接通过化学偶联制成半抗原-蛋白质结合物包被在固相上，成为固相抗原，固相抗原和样本中的待测抗原共同竞争有限量的Eu^{3+}标记抗体，样本中待测抗原浓度越高，则Eu^{3+}标记抗体结合到固相上的量越少，故待测抗原浓度和荧光强度成反比。

固相抗体竞争法

待测标本中抗原和Eu^{3+}标记的抗原与固相抗体（特异性抗体包被固体）发生竞争性结合，温育和洗涤后，去除游离Eu^{3+}标记抗原，然后在固相中加入荧光增强剂，测定Eu^{3+}标记抗原-抗体复合物的荧光强度。荧光强度与待测抗原含量成反比。

（三）应用

时间分辨荧光仪和相应TRFIA配套试剂盒的供应，TRFIA技术在临床实验诊断方面涉及多种检测项目，主要用于测定蛋白质、酶、肽类激素、类固醇激素、肿瘤标记物及病毒抗原等。在临床生化检测方面，涉及的检测项目包括甲状腺激素（T3，T4）、游离甲状腺原氨酸（FT3）、游离甲状腺素（FT4）、促甲状腺激素（TSH）、甲状腺结合球蛋白（TBG）、甲状腺球蛋白（TG）、胰岛素、生长激素（GH）、固醇类激素、促卵泡激素（FSH）、黄体生成素（LH）、绒毛膜促性腺激素（HCG）、催乳素、雌二醇（E2）、雌三醇（E3）、睾酮、胃泌素、妊娠相关蛋白A（PAPPA）、血清叶酸（FA）、维生素B_{12}（$VitB_{12}$）、转铁蛋白等；在肿瘤标志物检测方面，涉及甲胎蛋白（AFP）、癌胚抗原（CEA）、CA-50、CA-125、CA-153、CA-199、CA-242、CA250、CA-724、CY211、前列腺特异性抗原（PSA）、β2-微球蛋白、神经元特异性烯醇化酶（NSE）、

前列腺特异酸性磷酸酶（PAP）等；在微生物检测方面，有肝炎病毒标志物，包括HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb、HCV；HIV、风疹病毒抗体、弓形体IgM和IgA抗体。此外，采用铕标记的链霉亲和素-生物素核酸探针，还可以用于检测HIV、腺病毒、肺炎链球菌等病原微生物的DNA等；在免疫学指标检测中，还可以应用于细胞因子、补体（C3，C4）等的检测。

TRFIA在灵敏度、特异性和稳定性等方面可与放射免疫测定法（RIA）相媲美。其线性范围宽（跨越4或5个数量级）、分析速度快，远远超过RIA、常规免疫荧光技术、酶免疫测定技术。此外，标记物制备较简单，对被标记物的生物活性和结构无影响，大大降低了非特异性信号，具有极高的信噪比，标记物有效期长，无放射性污染，应用范围广，测定自动化程度高，因而成为很有推广价值的超微量物质免疫分析技术。

（刘书逊）

参考文献

李成文. 1992. 现代免疫化学技术. 上海：上海科学技术出版社：97～100.

Bazin H, Prèaudat M, Trinquet E, et al. 2001. Homogeneous time resolved fluorescence resonance energy transfer using rare earth cryptates as a tool for probing molecular interactions in biology. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 57 (11): 2197～2211.

Gratama JW, D'hautcourt JL, Mandy F, et al. 1998. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis. Cytometry, 33 (2): 166～178.

Miller DM, Shakes DC. 1995. Immunofluorescence microscopy. Methods Cell Biol, 48: 365～394.

Park SH, Raines RT. 2004. Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions. Methods Mol Biol, 261: 161～166.

Smith DS, Eremin SA. 2008. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. Anal Bioanal Chem, 391 (5): 1499～1507.

Wu FB, Han SQ, Zhang C, et al. 2002. Synthesis of a highly fluorescent beta-diketone-europium chelate and its utility in time-resolved fluoroimmunoassay of serum total thyroxine. Anal Chem, 74 (22): 5882～5889.

Yuan J, Matsumoto K, Kimura H. 1998. A new tetradentate beta-diketonate—europium chelate that can be covalently bound to proteins for time-resolved fluoroimmunoassay. Anal Chem, 70 (3): 596～601.

Yuan J, Wang G. 2005. Lanthanide complex-based fluorescence label for time-resolved fluorescence bioassay. J Fluoresc, 5 (4): 559～568.

Zhou G, Cummings R, Hermes J, et al. 2001. Use of homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer in the measurement of nuclear receptor activation. Methods, 25 (1): 54～61.

第十三章　放射免疫技术

20世纪50年代，Yalow和Berson等偶然观察到^{131}I标记的胰岛素与胰岛素抗体的结合与该体系中存在的非标记胰岛素的量呈一定的相关关系（Yalow and Berson，1960），从而创立了放射免疫分析法（radioimmunoassay，RIA），开辟了医学生物学检测史上的新纪元，该法的建立对医学的发展起到了巨大的推动作用，使得人类能够简便、灵敏地检测各种微量的生物活性物质，彻底改变临床医学特别是内分泌诊断学的现状，Yalow因此于1977年荣获诺贝尔生理学或医学奖。

这一成果把免疫分析推向了微量和超微量（浓度为10^{-9}～10^{-15}g/ml）水平，从而使人们有可能从分子水平重新考察生物活性物质在生命现象中的作用。这一新技术迅速渗透到医学科学的其他领域，如病毒学、药理学、血液学、免疫学、法医学、肿瘤学等，以及与医学生物学相关的学科，如农业科学、生态学、环境科学等。放射免疫检测的物质由激素扩大到几乎一切生物活性物质，如维生素、肿瘤相关抗原或抗体、药物、病毒和寄生虫所释放的物质等，其中有些物质具有复杂的大分子结构，只是在分子构型或个别原子位置上存在微小差异。

放射免疫分析法是一种放射性竞争结合分析（competitive radioactive binding assay），随后又相继建立了放射性非竞争结合分析（no-competitive radioactive binding assay），如免疫放射分析（immunoradiometric assay，IRMA）（Miles and Hales，1968）和放射受体分析（radioreceptor assay，RRA）等。

随着高新技术（如单克隆抗体制备技术、基因重组技术、电子计算机技术、信息处理技术、新材料合成技术等）的同步发展，放射免疫分析以及相关技术更趋完善，为该技术大范围普及与更新换代创造了条件。

第一节　标记抗原的放射免疫技术

一、放射免疫技术原理及应用

（一）放射免疫技术原理

抗原遇到相应的抗体便形成抗原-抗体复合物，用放射性同位素标记抗原再与相应的抗体结合便形成标记抗原和抗体复合物。当标记抗原（＊Ag）和未标记抗原（Ag）一起加入到含有其特异性抗体（Ab）的体系中时，两种抗原竞争性地结合特异性抗体，反应达到平衡后，形成有标记抗原-抗体复合物以及非标记抗原-抗体复合物，分离并测定结合的抗原-抗体复合物的放射性（B）和游离抗原放射性（F）。生成标记抗原-抗体

复合物与非标记抗原的含量在一定的限度内是成反比的，所以利用这个原理可以测定未知抗原。

为了达到生成标记抗原-抗体复合物与非标记抗原的含量在一定的限度内是成反比的测量状态，建立 RIA 必须满足以下 3 个条件：① 标记抗原和非标记抗原具有相同的免疫活性；② 特异性抗体（Ab）与标记抗原（＊Ag）的量是一恒量；③ 标记抗原（＊Ag）和未标记抗原（Ag）的分子数大于抗体（Ab）的分子数。只有满足这些条件才能使标记抗原和非标记抗原竞争地结合其特异性抗体。其竞争性结合模式可以用下式表示：



从上式可以看出，当反应体系中＊Ag 和 Ab 的量恒定时，形成＊AgAb 复合物（B）的多少取决于体系中 Ag 的量。如果 Ag 多，则＊AgAb 生成量减少，游离＊Ag（F）的剩余量就多。相反，Ag 少，则＊AgAb 生成量就多，游离＊Ag 的剩余量就少（图 13-1，见书后彩图）。当标记抗原、非标记抗原和特异性抗体三者同时存在于一个反应系统时，由于标记抗原和非标记抗原对特异性抗体具有相同的结合力，两者相互竞争结合特异性抗体。由于标记抗原与特异性抗体的量是固定的，故标记抗原-抗体复合物形成的量就随着非标记抗原的量而改变。非标记抗原量增加，相应地结合较多的抗体，从而抑制标记抗原对抗体的结合，使标记抗原-抗体复合物相应减少，游离的标记抗原相应增加，即抗原-抗体复合物中的放射性强度与受检标本中抗原的浓度成反比。若将抗原-抗体复合物与游离标记抗原分开，分别测定其放射性强度，就可计算结合态的标记抗原（B）与游离态的标记抗原（F）的比值（B/F），或算出其结合率［$B/(B+F)$］，这与标本中的抗原量呈函数关系。

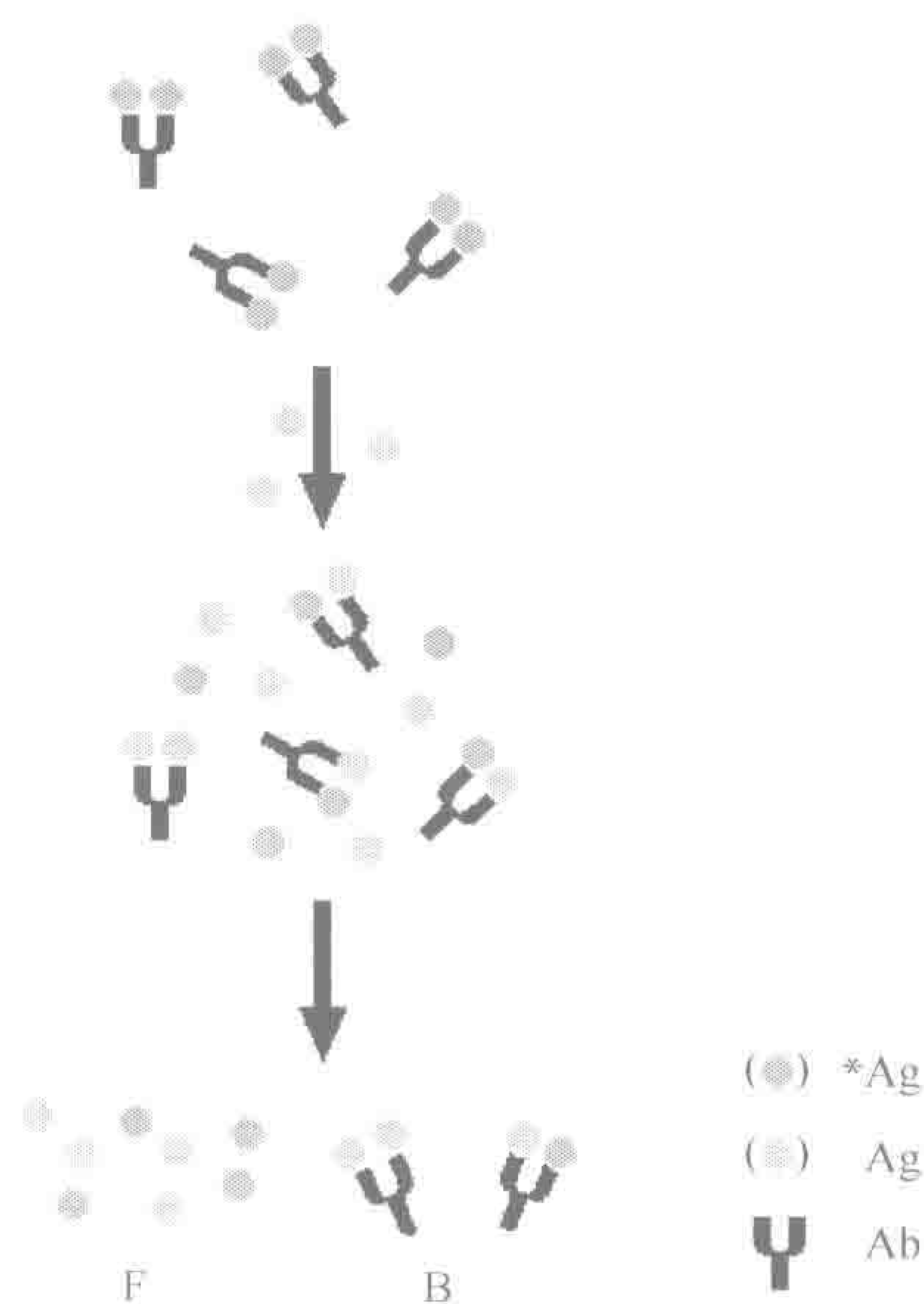


图 13-1　放射免疫分析原理示意图

在实际工作中需要绘制标准曲线，首先配制一系列已知浓度的标准溶液，并各取一定体积于其中加入一定量的＊Ag 和 Ab；在一定条件下使之反应平衡后，采取适当方法将 B 与 F 分离，获得各标准浓度试管的＊AgAb 量，根据不同的计算方法可以绘制以下 4 种标准曲线（图 13-2）。对样品中抗原的测定，则可在同样条件下操作，在标准曲线上查得含量。目前采用专用分析软件进行标准曲线拟合直接计算出待测 Ag 的浓度。

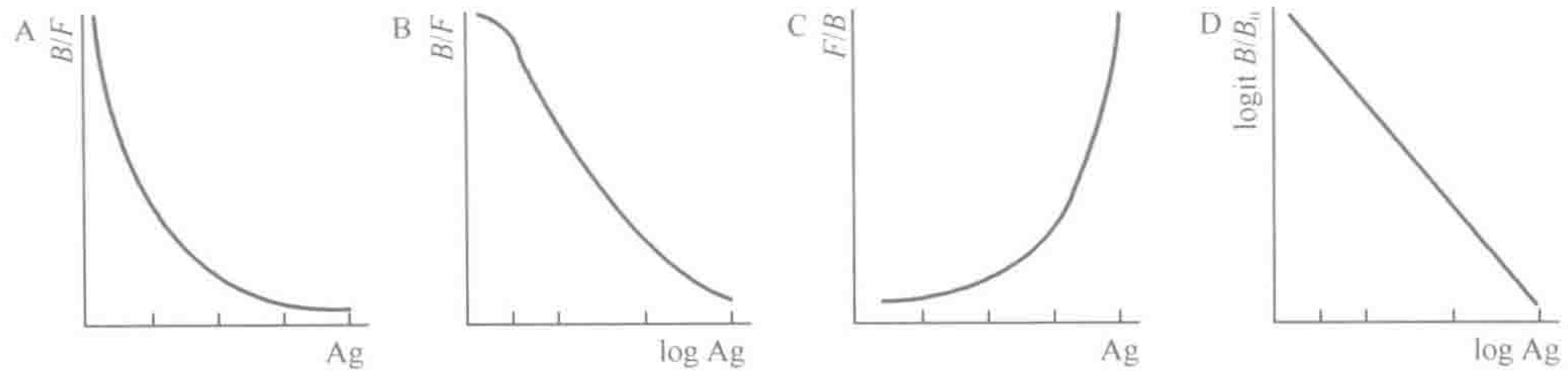


图 13-2　放射免疫分析标准曲线

A. 以标准品浓度为横坐标，B/F 为纵坐标，呈双曲函数；B. 以标准品浓度的对数为横坐标，B/F 为纵坐标，曲线呈反 S 形；C. 以标准品浓度为横坐标，F/B 为纵坐标，呈双曲函数；D. 以标准品浓度的对数为横坐标，logit B/B_0 为纵坐标，标准曲线为从左到右的渐降直线

（二）放射免疫技术的优缺点

1. 放射免疫技术的优点

放射免疫分析（RIA）具有许多其他分析方法无可比拟的优点。它既具有免疫反应的高特异性，又具有放射性测量的高灵敏度，因此能精确测定各种具有免疫活性的极微量的物质。

1）灵敏度高，一般化学分析法的检出极限为 $10^{-3}\sim10^{-6}$ g，而 RIA 通常为 10^{-9}（纳克，ng）、10^{-12} g（皮克，pg），甚至 10^{-15} g（飞克，fg）、10^{-18} g（阿克，ag）。

2）特异性强，由于抗原-抗体免疫反应专一性强，所以被测物一定是相应的抗原。良好的特异性抗体能识别化学结构上非常相似的物质，甚至能识别立体异构体。

3）应用范围广，据不完全统计，目前至少已有 300 多种生物活性物质已建立了 RIA。它几乎能应用于所有激素的分析（包括多肽类和固醇类激素），还能用于各种蛋白质、肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原、寄生虫抗原，以及一些小分子物质（如环型核苷酸等）和药物（如地高辛、毛地黄甙等）的分析，应用范围还在不断扩展。近年来由于小分子半抗原制备抗体的技术有很大的发展，有人预测，只要含量不低于 RIA 的探测极限，几乎所有的生物活性物质都可建立适当的 RIA 法。

4）操作简便，RIA 所需试剂品种不多，可制成配套试剂盒；加样程序简单，一次能分析大量标本，标本用量也少；反应时间不长；测量和数据处理易于实现自动化；RIA 属体外分析技术，对患者无任何辐射危害。

2. 放射免疫技术的缺点

1）只能以免疫反应测得具有免疫活性的物质，对具有生物活性但失去免疫活性的物质是测不出的。因此 RIA 结果与生物测定结果可能不一致。

2）由于使用了生物试剂，其稳定性受多种因素影响，需要有一整套质量控制措施来确保结果的可靠性。

3）灵敏度受方法本身工作原理的限制，对体内某些含量特别低的物质尚不能测定。

4）由于 RIA 是竞争性的反应，被测物和标准物都不能全部参与反应，测得的值是相对量而非绝对量。

5）存在放射线辐射和污染等问题。

尽管 RIA 存在以上缺点，但它毕竟是定量分析方法的先进技术。随着科学技术的进步，放射免疫分析技术将会得到更加广泛、更加深入的发展。

（三）放射免疫技术的应用

近 50 年来，由于 RIA 灵敏、特异，已经制成很多种标准的检测试剂盒，这些试剂盒使用方便，使放射免疫技术得到了广泛的应用，目前国外成功应用放射免疫技术检测的物质多达 300 多种，国内研究的被检测物质也达 100 多种。常见的一些放射免疫检测见表 13-1。

表 13-1　常见放射免疫检测

应用领域	检测抗原
肿瘤诊断	甲胎蛋白放射免疫分析（AFP）
	癌胚抗原放射免疫分析（CEA）
	糖蛋白抗原放射免疫分析（CA19-9）
	糖蛋白抗原放射免疫分析（CA-125）
	糖蛋白抗原放射免疫分析（CA15-3）
	糖蛋白抗原放射免疫分析（CA-242）
	β2-微球蛋白放射免疫分析（β2-MG）
	铁蛋白放射免疫分析（SF）
	前列腺特异抗原放射免疫分析（PSA）
垂体性腺激素诊断	卵泡刺激素放射免疫分析（FSH）
	黄体生成激素放射免疫分析（LH）
	睾丸酮放射免疫分析（T）
	雌二醇放射免疫分析（E2）
	孕酮（黄体酮）放射免疫分析（P）
	催乳素放射免疫分析（PRL）
	人生长激素放射免疫分析（HGH）
	人绒毛膜促性腺激素放射免疫分析（HCG）
	人胎盘催乳素放射免疫分析（HPL）
甲状腺激素诊断	三碘甲状腺原氨酸放射免疫分析（T3）
	甲状腺素放射免疫分析（T4）
	促甲状腺素放射免疫分析（TSH）
	游离三碘甲状腺原氨酸放射免疫分析（FT3）
	游离甲状腺素放射免疫分析（FT4）
	甲状腺球蛋白抗体放射免疫分析（TG）

续表

应用领域	检测抗原
传染病诊断	甘胆酸放射免疫分析（CG）
	透明质酸放射免疫分析（HA）
	乙型肝炎表面抗原放射免疫分析（HBsAg）
	乙型肝炎 e 抗原放射免疫分析（HbeAg）
	乙型肝炎核心抗体放射免疫分析（HbcAg-lgM）
	乙型肝炎澳抗放射免疫分析（HbsAg-lgM）
消化系统疾病	血清胰岛素放射免疫分析（ins）
	血清 C 肽放射免疫分析（CP）
	胃泌素放射免疫分析
	胰岛素放射免疫分析
	胰高血糖素放射免疫分析
	血清胰高血糖素放射免疫分析（gl）
心血管系统疾病	肾素-血管紧张素放射免疫分析
	醛固酮放射免疫分析
	血栓素 B2 放射免疫分析
	心钠素放射免疫分析
细胞信使物质	环-磷酸腺苷放射免疫分析
	环-磷酸鸟苷放射免疫分析
	环核苷酸放射免疫分析
骨代谢疾病	降钙素放射免疫分析
	骨钙素放射免疫分析
免疫性疾病	免疫球蛋白 G 放射免疫分析
	分泌型免疫球蛋白 A 放射免疫分析
	免疫球蛋白 E 放射免疫分析
临床血液药物浓度监测	地高辛药物浓度放射免疫分析
	庆大霉素药物浓度放射免疫分析
	苯妥英钠药物浓度放射免疫分析

二、实验方法

（一）基本试剂

1. 标准品

标准品是放射免疫分析法定量的依据，由于标准品的量用来表示被测物质的量，故标准品与被测物质应当化学结构一致并具有相同的免疫活性。标准品作为定量的基准，

应要求高度纯化。标准品除含量应具有准确性外，还应具备稳定性，即在合理的储存条件下保持原来的特性。按实验要求，将标准品用缓冲液配成含不同剂量的标准溶液，用于制作标准曲线。

2. 抗原

标记抗原应具备：①比放射性高，以保证方法的灵敏度；②免疫活性好；③所用的核素的半衰期尽可能长，标记一次可较长时间使用，这对来之不易的抗原尤其重要；④标记简便、易防护。要准确测量 B 与 F 的放射性，必须有足够的放射性强度。所选用的标记抗原的量，在使用^{125}I时达 5000～15 000cpm。

3. 抗体

应选择特异性高、亲和力强及滴度好的抗体，用于放射免疫测定。根据稀释曲线，选择适当的稀释度，一般以结合率为 50%作为抗血清的稀释度。

（二）抗原的标记

放射性同位素选择的原则：①测定方法简单、经济、便于推广应用；②易于防护；③同位素与标记物结合好，不易从标记物上脱落；④对标记物不引起辐射损伤，使蛋白质变性；⑤具有较高的计数效率。

目前常用的同位素有^{3}H、^{125}I，其他还有^{14}C、^{35}S 和^{32}P 等。不同的同位素有各自的特性，实验中可以酌情选择合适的同位素进行标记，以下为常用同位素的简单特性介绍：① ^{3}H 因所有的有机化合物中均含有氢，用^{3}H 来置换氢，不至于影响其原有化合物的化学性质。^{3}H 的半衰期长，是一个弱 β 衰变，能量低，便于防护。一次标记可以使用较长时间，采用闪烁仪测量，测量效力可达 60%。^{3}H 标记要求条件较高，一般需由专门机构来承担，不易推广。② ^{125}I 碘标记的化合物比度高，标记方法简便，而且标记物可在碘化钠晶体闪烁计数器上直接测定。^{125}I 发射 γ 射线，含有酪氨酸的蛋白质和多肽均可用放射性^{125}I 标记。目前，连接标记技术已有很大发展，致使许多非蛋白质和多肽的半抗原也可以用碘来标记。另外碘的放射能量较大，半衰期也较短。虽然^{125}I 的放射比活性仅为^{131}I 的 13%，但^{125}I 的半衰期较^{131}I 长，同位素丰度大，辐射损伤小，计数效率也较高，因此^{125}I 比^{131}I 更为常用。以下介绍几种比较常用的抗原碘化标记法。

1. 氯胺 T 法

原理

氯胺 T 是氯代酰胺类氧化剂，在水溶液中容易水解生成次氯酸，将$^{125}I^-$氧化成放射性单质碘（$^{125}I_2$），然后取代酪氨酸残基苯环上的氢原子，或与组氨酸残基的咪唑环共价连接，使蛋白质或多肽发生碘化反应。

材料与试剂

0.05mol/L 和 0.1mol/L，pH7.4 磷酸缓冲液（PB）

氯胺 T 溶液：用 0.05mol/L，pH7.4 PB 配制成 1mg/ml，新鲜配制，即配即用

偏重亚硫酸钠溶液：用 0.05mol/L，pH7.4 PB 配制成 2mg/ml，新鲜配制

KI溶液：用0.05mol/L，pH7.4 PB配制成2mg/ml

待标记的蛋白质或多肽：用0.05mol/L，pH7.4 PB配制成1mg/ml

$Na^{125}I$溶液（3.7GBq/ml）

分离柱和Sephadex G50凝胶

0.05mol/L，pH7.4磷酸盐缓冲液（PBS）

放射性薄层扫描仪和活度计

步骤

1）取50ml 0.1mol/L，pH7.4 PB，加入有盖反应瓶。

2）加入待标记的蛋白质或多肽5ml。

3）加入$Na^{125}I$溶液5ml。

4）加入氯胺T溶液20～50ml，反应2min。

5）加入偏重亚硫酸钠溶液20～50ml，反应1min。

6）加入2%的KI溶液，稀释残留的碘化物。

7）取少量反应液，点在Whatman 1纸上。

8）在正丁醇：乙醇：氨水＝5：1：2系统中进行层析，晾干后，在放射性薄层扫描仪上测量3个峰，并计算碘利用率。

9）将反应液过Sephadex G50柱（Sephadex G50制柱：取1g Sephadex G50在0.05mol/L，pH7.4 PBS中浸泡24h以上，其间多次轻轻摇动漂去细小颗粒，待其充分膨胀后，抽气减压约30min，排出其中气泡；然后将凝胶加入玻璃层析管中，使其自然下降）。柱预先用0.05mol/L，pH7.4的PBS平衡，再用BSA 20mg（溶于1ml 0.05mol/L，pH7.4 PBS中）过柱，使柱饱和，用20ml 0.05mol/L，pH7.4的PBS流洗后即可上样，洗脱后，收集洗脱液2ml/瓶。

10）分别在活度计上测量并绘制曲线，合并蛋白质峰，加入适量BSA和NaN_3，分装冻存或冷冻干燥。

质量鉴定

1）碘利用率/%＝C_1/（$C_1+C_2+C_3$）×100%

2）免疫活性/%＝$C_0/C_t\times100\%$

3）比活度/（Bq/mg）＝A/m

式中，C_1、C_2、C_3分别为峰1、峰2、峰3的放射性强度（cpm）；C_0是用10倍的标准抗体与标记抗原充分反应后形成复合物的放射性计数率；C_t为每管加入的标记抗原总放射性计数率；A为放射性活度，是标记时加入的放射性碘的活度乘以碘利用率；m为蛋白质的化学量。

注意事项

1）氯胺T法操作简单，费时少，能使大量^{125}I结合到蛋白质上，但要注意尽量减少因放射性碘化反应引起的蛋白质生物活性的损伤，应使用无还原剂和高比度的$Na^{125}I$。

2）抗原量尽量少，当投入的放射碘量一定时，多肽、蛋白质用量多，虽然能获得

高碘利用率，但所得标记蛋白比放射强度低。

3）氯胺 T 用量不易过高，氯胺 T 是氧化剂，氯胺 T 用量比较大，结果导致蛋白质结构和活性的严重损伤，使标记多肽、蛋白质活性下降。

4）总反应体积宜小。碘化反应体积越小，局部反应物浓度越高，所得碘利用率和标记多肽、蛋白质比放射强度就越高。

5）反应的 pH 会影响标记效果，最适 pH 约为 7.5，当 pH 小于 6.5 或大于 8.5 时，标记率明显下降。

2. 乳过氧化物酶法

原理

乳过氧化物酶（LPO）与 H_2O_2 首先形成络合物，将 $^{125}I^-$ 氧化成放射性单质碘（$^{125}I_2$），在乳过氧化物酶催化下，蛋白质被碘化。

材料与试剂

LPO 溶液：用 0.05mol/L。pH7.4 的 PB 配制成 12mmol/L

H_2O_2：用去离子水新配制成 1mmol/L

半胱氨酸溶液：0.05mol/L。pH7.4 的 PB 配制成 5mmol/L

其余同上述"1. 氯胺 T 法"

步骤

1）取 50ml 0.1mol/L。pH7.4 PB，加入有盖反应瓶。

2）加入 20ml $Na^{125}I$ 溶液，混匀。

3）加入待标记的蛋白质或多肽 5ml。

4）加入 LPO 溶液 5ml。

5）加入 10ml H_2O_2 溶液，混匀，室温下反应 10min。

6）再次加入 10ml H_2O_2 溶液，混匀，室温下反应 10min。

7）加入半胱氨酸溶液 500ml，终止反应。

8）加入 2%的 KI 溶液，稀释残留的碘化物。

9）其余步骤同上述"1. 氯胺 T 法"。

注意事项

1）LPO 质量好坏，可直接影响标记率，LPO 应在使用前新鲜配制，以防酶活性降低。

2）LPO 用量应小于总蛋白质用量的 1%，以减少酶自身碘化而带入的放化杂质。

3）碘化反应速率分析表明，酶的催化速度很快；碘化反应在 pH4.0～8.5 较宽范围内均可进行，最适 pH 应依据蛋白质本身性质而定。

4）H_2O_2 应保持低浓度，如高于 0.1mmol/L，对酶的活性将有抑制作用。

3. 其他标记方法

1）氯甘脲法：氯甘脲和氯胺 T 同属于氯酰胺碘化反应类型，是一种不溶于水的固相氧化剂，能将 $^{125}I^-$ 氧化成放射性单质碘（$^{125}I_2$），从而与蛋白质和多肽分子中

酪氨酸残基上羟基邻位的氢发生置换反应。

2）连接标记法：又称为间接标记法，此法先用^{125}I标记一个可与蛋白质或多肽交联的小分子物质，然后再将其与抗原连接。在结合反应中无需再加入氧化剂或还原剂，不存在损伤抗原免疫活性的问题。因此适合标记对氧化敏感的蛋白质或多肽，以及碘化那些不含酪氨酸，而只有脂肪族氨基的半抗原和酪氨酸残基末端未暴露在外面的化合物。但其缺点是添加基团可能会改变被标记蛋白质或多肽的某些性质，对抗原的免疫活性产生影响；还有就是标记效率差，操作复杂。现在常用3-(4羟基苯)-丙酸-*N*-琥珀酰胺酯（HPNSE）作为连接剂，先用^{125}I标记羟基苯，再将琥珀酰胺酯水解，通过酰胺键将3-(4羟基-5-苯基）连接在蛋白质或多肽的末端氨基上。

3）半抗原的碘标记：在临床上绝大多数药物属于半抗原，观察药物在体内的疗效和毒性时，需要测定血、尿等体液中的药物含量。半抗原的碘标记有以下两种方法：①直接碘标法：先在激素等半抗原分子上连接芳香族胺、组氨酸甲酯或酪氨酸甲酯，然后用氯胺 T 法标记^{125}I，此法的缺点是标记时容易丧失免疫活性；②间接碘标法：先用氯胺 T 法将^{125}I标记到酪氨酸或酪胺、组氨酸或组胺等衍生物上，经纯化后再将其与类固醇衍生物反应。与前述的连接标记法相似，利用组胺的氨基与类固醇衍生物的羟基反应而连接。此外，酪氨酸或组氨酸衍生物的碘化作用能制备出反应灵敏的标记物，它能与任何蛋白质或含氨基的半抗原连接。

4. 标记物的鉴定

1）放射性化学纯度鉴定：是指某一化学形式的放射性物质的放射强度在该样品中所占放射性总强度的百分平。鉴定方法：取标记的蛋白质或多肽抗原液少许，加入 1%～2% 载体蛋白及等量的 15% 三氯乙酸，摇匀静置数分钟后，3000r/min 离心 15min，分别测上清（含游离碘）及沉淀（含标记抗原）的放射活性。一般要求游离碘含量占总放射性碘的 5%以下。标记抗原储藏较久后，仍有部分放射碘从标记物上脱落下来，使用时应除去后再用，否则影响放射免疫分析的精确度。

2）免疫化学活性鉴定：采用碘标记的抗原，通常由于氧化剂的作用可引起部分活性的损伤，而采用^{3}H、^{14}C等标记的抗原，则不改变抗原的化学结构。免疫活性的检查方法：少量的标记抗原与过量的抗体，在适当的条件下充分反应后，分离 B、F，分别测定其放射性，算出结合百分率。此值应在 80%以上，最大可超过 90%。该值越大，表示标记的免疫化学活性损失越少。

3）放射性强度：放射性强度以比度表示，即单位重量抗原的放射性强度。比度越高，敏感性越高。因此根据测定需要的敏感度，要求适当比度的标记抗原。标记抗原比度的计算是依据放射性碘的利用率。

（三）标记的抗原（B）与未标记的抗原（F）的分离

当标记的抗原与未标记的抗原和抗体结合后，均形成抗原-抗体复合物。其浓度低，

不能自动沉淀。而放射免疫测定的终点决定于标记抗原与竞争者的结合比，因此将抗原-抗体复合物与游离的标记抗原分离完全是放射免疫测定的关键。

分离方法的选择主要根据抗原的特性，待测生物液体的体积，测定需要的敏感度、精确性等。较常用的 B、F 分离法如下。

1. 盐析法

盐析法利用 33%饱和硫酸铵液可使其抗原-抗体复合物沉淀下来。向溶液内加入饱和硫酸铵，使其最终饱和度达到 36%左右，摇匀静置，然后离心沉淀即为标记抗原-抗体复合物，而游离的标记抗原仍留于溶液中。此法的缺点是，游离抗原也同时有随标记抗原-抗体复合物沉淀的可能。

2. 双抗体法

双抗体法是目前常用的方法，抗体在与标记抗原结合后，同时还具有对抗抗体的结合能力，因此用第一抗体去注射另一种动物，获得第二抗体（即抗抗体）。当第一抗体与标记抗原形成复合物时再遇上第二抗体即形成 $*Ag\text{-}Ab_1\text{-}Ab_2$（也有 $Ag\text{-}Ab_1\text{-}Ab_2$）更大的复合物而沉淀下来。达到与游离的抗原分离的目的。此法比较温和，分离也较完全（可达 80%～90%）。

3. 清蛋白（或葡聚糖衣）活性炭吸附法

清蛋白（或葡聚糖衣）活性炭吸附法是将活性炭悬浮于一定浓度的葡聚糖水溶液中（或清蛋白），葡聚糖分子在活性炭表面形成一层具有一定孔径网眼的膜，这层膜只允许较小的分子吸附于上面，进而被活性炭所吸附，大分子的物质被排在门外，不被活性炭吸附，从而达到分离的目的。最佳分离条件是 pH6.5～9.4，放置 15～30min。此法快速、方便而且分离效果好。但是当标记抗原与抗体结合不牢固时，待游离抗原被活性炭吸附后打破了抗原抗体反应的平衡，而造成抗原-抗体复合物的离解。在这种情况下，此法不能应用。

三、放射免疫分析的应用举例

重组人白细胞介素-2（hIL-2）是一种生物制剂，一般制成粉针剂使用，其规格一般采用活性单位而不是以重量单位标示，下面是采用放射免疫分析法测定注射用粉针剂中重组 hIL-2 含量的方法介绍（张玉等，2005）。

材料与试剂

hIL-2 标准品

^{125}I-hIL-2

抗 hIL-2 抗体

待测样品：重组 hIL-2 冻干粉剂

放射免疫 γ 测量仪

试管

加样器

离心机等

步骤

1. 标准曲线的绘制

吸取各浓度（0、1.2μg/L、3.0μg/L、9.0μg/L、27.0μg/L、81.0μg/L）的标准品 200μl 置于 5ml 离心管中，每种浓度设一个重复管。另设 T 管（总计数管）和 NSB 管（非特异性结合管）。其余的按浓度依次编号 1～6 号，向 T 管中加入 100μl 标记抗原，NSB 管中加入 100μl 标记抗原和 100μl 注射用水，其余各管分别加入标记抗原 100μl 和抗体 100μl 充分混匀后，置于 4℃温箱中温育。24h 后取出，向 1～6 管中加入分离剂 500μl，充分混匀，T 管中不加分离剂。室温静置 15min，放入离心机离心（3600r/min）20min 后弃上清，测定沉淀物放射性强度（取其两支平行管的平均值，以 B 表示），第一管均值为 B_0，根据 B/B_0 算出 2～6 管的 B/B_0 值。以各标准管的 logit B/B_0 值为纵坐标、标准物浓度（μg/L）的自然对数值（lnC）为横坐标制作标准曲线。

2. 冻干粉剂中 hIL-2 含量的测定

精密称取适量 hIL-2 冻干粉加 1.0ml 注射用水溶解，摇匀。再将溶液稀释 10 倍。成对设置 20 支试管并编号 1～10 号，精确吸取上述溶液各 200μl 置于试管中，然后向各管中加入标准抗原 100μl 和抗体 100μl，充分混匀后，置 4℃温箱中温育。24h 后取出，加入分离剂 500μl，充分混匀。室温静置 15min，放入离心机离心（3600r/min）20min 后弃上清，测定沉淀物放射性强度计数 B（取其两支平行管的平均值）。计算出各管的 B/B_0，再根据标准曲线求得各管的浓度。

第二节　标记抗体的免疫放射技术

一、免疫放射技术原理

1968 年 Miles 和 Hales 应用同位素标记的抗胰岛素抗体检测牛血清中胰岛素获得成功，标志免疫放射技术（IRMA）的建立。IRMA 的原理属于非竞争性免疫结合反应，是将放射性同位素标记在抗体上，用过量的标记抗体（＊Ab）与待测抗原反应，反应式为 Ag＋＊Ab＝Ag＊Ab＋＊Ab。待充分反应后，除去游离的标记抗体，Ag＊Ab 结合物的放射性强度与待测抗原量呈正比关系，即待测抗原含量越多，复合物的计数率就越高，反之则越低。以下是 IRMA 的原理示意图，待测抗原与过量的标记抗体进行温育，使二者结合，然后加入固相抗原免疫吸附剂再次温育，吸附游离的标记抗体。离心去除沉淀物，测定上清中放射性强度，根据标准曲线即可得知待测样品中抗原的含量（图 13-3）。

IRMA 是目前最常用的体外分析技术之一，其具有敏感性高、特异性强、标记物稳定、容易标记、结果稳定等优点。但其也有抗体用量偏多，而且抗体的特异性纯化较难等缺点。

IRMA 与 RIA 相比有以下特点：①IRMA 反应系统中应用的标记物为免疫球蛋白。易于提纯和进行碘化标记，标记抗体的比活度较高，有利于提高分析的灵敏度，且不同

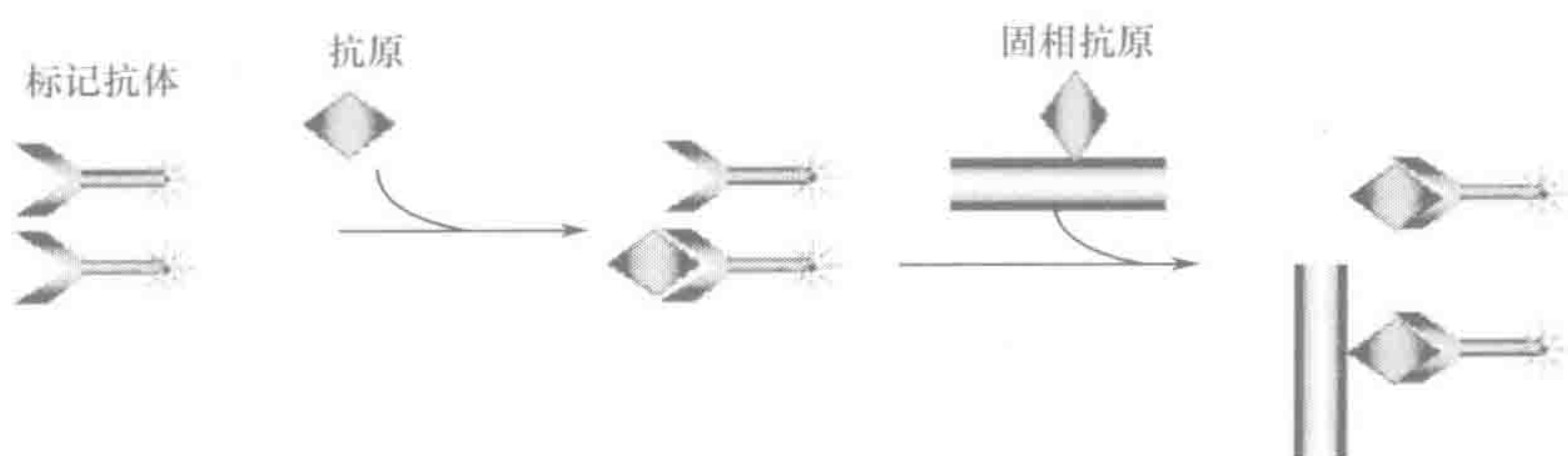


图 13-3　免疫放射分析原理示意图

抗体的标记方法基本相同；而在 RIA 中应用的标记物是抗原。抗原种类繁多，化学结构各异，较难获得纯品，标记方法也多种多样。②在 IRMA 反应系统中使用过量的标记抗体，直接与抗原结合，不存在竞争结合的复杂反应，因此反应速度较快，即使使用亲和力较低的单克隆抗体，也能满足实验要求；而在 RIA 中抗体是微量的，所以一定要用高亲和力的多克隆抗体。③IRMA 使用的标记抗体和固相抗原在反应中都是过量的，只有待测样品加样误差才会影响分析结果，因此 IRMA 的批内和批间变异比较小；而 RIA 使用的抗体和标记抗原在反应中是固定量的，加样误差可严重影响测定结果。

1. 标记抗体的制备

特异性抗体的制备，质量要求及^{125}I 标记方法与 RIA 基本相同。抗体 IgG 分子中含有多个氨基酸残基，经过碘化反应后，不影响其免疫学活性，并能结合较多的碘原子，标记物的比放性高，克服了 RIA 中某些抗原不易标记，或在标记过程中容易发生化学或放射性损伤等缺点。同时纯化的抗体比抗原的纯品来源更为丰富。标记抗体的方法比较单一，也易于掌握，不同于标记抗原，每一种抗原必须标记一次，且抗原复杂，多种多样，标记方法也多种多样。如果将抗体分子酶解成 Fab 片段，形成单价抗体，再进行标记，其敏感性将显著高于一般的 IRMA。

2. 免疫吸附剂的制备

免疫吸附剂是将高纯度的抗原连接在固相载体上而制成的。所用固相载体要求对抗原的结合力强，对非特异性蛋白质的吸附性能低，且具有高度的分散性，这样才能大量结合特异性抗体。一般采用重氮化的纤维素、溴化氰化的纤维素、琼脂糖 4B 珠、聚丙烯酰胺、葡聚糖凝胶和玻璃粉等作为抗原吸附剂的固相载体。

近年来发展建立的双抗体夹心 IRMA 法，用固相抗体代替抗原免疫吸附剂，反应后形成固相抗体-抗原-标记抗体复合物，经过洗涤即可除去游离的剩余标记抗体，简化了分离步骤，并保证了较高的特异性。

固相抗体的制备方法有两种：一种是物理吸附法，将塑料小珠浸泡在稀释的抗体中，用前经过洗涤即可。或者将抗体吸附在塑料试管中；另一种是采用化学连接法，将抗体较牢固地结合，这样洗涤时不易脱落。

3. 测定方法

IRMA 是将核素标记在抗体上，然后以过量的标记抗体与待测抗原结合，未结合的标记抗体通过和固相的抗原免疫吸附剂结合而去除，溶液中的放射性与待测抗原的含量

呈正相关。根据检测过程的操作步骤不同，有以下几种类型。

1）直接 IRMA 法：将待测抗原与过量的标记抗体进行温育，使二者结合，然后加入固相抗原免疫吸附剂再次温育，吸附游离的标记抗体。离心去除沉淀物，测定上清中放射性强度，根据标准曲线即可得知待测样品中抗原的含量。

2）双抗体夹心 IRMA 法：在待测抗原内依次加入固相抗体和标记抗体，反应后形成固相抗体（Ab1）-抗原-标记抗体（Ab2）复合物，洗涤去除游离的标记抗体，测定固相抗体或载体上免疫复合物的放射性强度，根据标准曲线即可得知待测样品中抗原的含量。此法仅用于检测有多个决定簇的多肽和蛋白质抗原。

3）间接 IRMA 法：此法是在上述双抗体夹心法的基础上，进一步改良为用核素标记抗 Ab2 的抗体（羊抗兔或抗鼠的 IgG），反应后形成固相抗体（Ab1）-抗原-Ab2-＊Ab3（标记抗抗体）的四重免疫复合物。其中，Ab3 可作为通用试剂，可省去标记针对不同抗原的特异性抗体。

4）BSA-IRMA 法：是将生物素-亲和素系统（biotin-avidin-system，BSA）引入 IRMA 而建立的新一代 IRMA。此法最大的优点是使用生物素化抗体和以核素标记亲和素为示踪剂，可以通用于甾体类、前列腺素等小分子物质的检测。1 个抗体分子可标记数十个生物素分子，而每个亲和素又可与 4 个生物素分子结合，从而产生多级放大效应。同时生物素与亲和素之间的亲和力要比抗原抗体间的亲和力大 10 万～100 万倍，二者结合极为稳定，因此，其灵敏度、特异性和精密度都大大提高。目前一些超灵敏度的 IRMA 分析试剂盒就是应用上述原理制成的。

二、免疫放射分析的应用举例

人血清中胰岛素（insulin，INS）的测定对于评估胰腺 β 细胞的分泌功能、糖尿病患者治疗方案的制定及胰岛素瘤的诊断具有重要意义，目前测定胰岛素以 RIA 为主，但是受血中胰岛素含量不均一性的影响，RIA 的特异性较差，采用双抗体夹心法的 IRMA 能提高胰岛素检测的特异性，下面是采用两株胰岛素单克隆抗体进行胰岛素测定的免疫放射分析法（董宏广等，2007）。

材料与试剂

^{125}I 标记抗胰岛素单克隆抗体（^{125}I-INS McAb）

INS McAb 包被管

标准抗原

待测标本

洗液：0.2mol/L，pH7.4 的磷酸缓冲液

包被缓冲液：0.1mol/L，pH 9.5 的碳酸盐缓冲液

封闭液：含 1% BSA 的 0.05mol/L，pH7.4 的磷酸缓冲液

标记抗体稀释液：含 0.2% BSA 的 0.05mol/L，pH7.4 的磷酸盐缓冲液

洗涤液：0.02mol/L，pH 7.4 的磷酸盐缓冲液

胎牛血清

γ计数仪

低温离心机等

步骤

1) ^{125}I-INS McAb 标记物的制备，用氯胺 T 法标记，高效液相色谱柱分离纯化。

2) 固相抗体的制备：用包被缓冲液将 INS McAb 稀释成 5mg/L，加入聚苯乙烯六角试管中，200μl/管，置 4℃ 过夜。次日倾去包被液，以 500μl/管加封闭液，37℃封闭 1h。弃去封闭液，自然晾干。

3) 胰岛素标准品的配制：胎牛血清 56℃灭活 4h，3000r/min 离心 20min 后，上清用于配制标准品。将不同量的胰岛素加入到灭活后的胎牛血清中，配制胰岛素浓度分别为 5mIU/L、10mIU/L、20mIU/L、40mIU/L、80mIU/L、160mIU/L 的标准品，用胰岛素放射免疫分析试剂盒校正该标准品的浓度。校正好的标准品以 0.5ml 分装，冻干，于 2～8℃ 保存。

4) 胰岛素免疫放射分析程序：在已包被抗体的包被管中（总 T 管除外）加入 100μl 胰岛素标准品和待测血清样品、100μl ^{125}I-INS McAb，混匀，37℃ 反应 3h。弃反应液，用洗涤液洗 3 次（每次 500μl），吸水纸吸干管口残液，用 γ 计数仪测量包被管的放射性计数。以胰岛素浓度（mIU/L）为横坐标，各标准点的结合率（B/T）为纵坐标，在双对数坐标纸上绘制标准曲线。根据样品的 B/T，从标准曲线上查出相应的胰岛素浓度，或者使用仪器内的计算程序直接获得样品中胰岛素浓度。

第三节 放射受体分析技术

一、放射受体分析技术原理

Langley（1878）在药理学研究中首先提出受体（receptor）学说，并且在药理学范围内进行了大量的研究工作。受体是存在于细胞表面、胞质或细胞核内的生物活性物质，其功能是和细胞外的信息分子（配体）特异性结合，将信息转变为生物效应。从 20 世纪 60 年代开始研究的放射受体分析（radioreceptor assay，RRA）利用放射性检测的灵敏性、受体配体结合的特异性，使受体的研究从依靠生理（药理）效应进行的间接观察进入能精确定量的直接观察，从宏观进入微观。受体现已可从细胞或组织中分离、提取，进行定量和定位分析。放射受体分析或受体的放射配体结合分析（radioligand binding assay，RBA）是目前对受体分子进行定量和定位分析研究的灵敏、可靠的一项技术。在药物设计、作用机制、生物效应及对疾病的病因探讨、诊断和治疗等方面的应用已有较大发展。放射受体分析的原理与免疫放射测定相似。应用放射性核素标记配体，在一定条件下与相应的受体结合形成配体-受体复合物。放射受体分析还可用于测定受体的亲和常数、解离常数、受体结合数，以及定位分析。

1. 放射受体分析的基本过程

利用放射性核素标记的配体与受体进行结合实验。取一定量组织，制备组织匀浆和

细胞悬液，测定组受体样品中加入放射性核素标记的配体，适宜的条件下温浴，达到反应平衡后，迅速过滤或离心分出放射性配体与受体的结合物，用缓冲液洗去尚未结合的放射性配体，测定标本的放射强度，这是放射性配体与细胞结合的总量（TB）。另一组受体样品中除加入放射性核素标记的配体外，再加入过量500～1000倍的非标记的配体竞争性地与受体结合，与测定组同样经过温浴和洗去未结合的放射性配体，再测量放射强度，代表非特异性结合量（NSB）。将总结合量减去非特异性结合量就可以得到配体受体特异性结合的量（SB）。

RRA不同于RIA和IRMA等分析法，受体不易制得标准品，不能利用标准品制备标准曲线或将未知样品与标准品进行比较测定。只能测定受体与放射性核素标记的配体形成的复合物的绝对放射性活度SB，再根据SB和放射性核素标记的配体的比放射性求得受体的分子数。

2. 受体标本的制备

1) RRA采用的受体标本形式主要有3种，分别的制备方法如下。①亚细胞组分：亚细胞组分需要将组织细胞打制成匀浆，经差速离心法分成细胞膜、细胞质、细胞核等亚细胞组分，按受体的分布情况选用不同的亚细胞组分。这种制备方式的优点是受体蛋白初步富集，减少大部分杂质蛋白和内源性配体等的干扰。②完整活细胞悬液：对体外培养的肿瘤细胞、血细胞和组织细胞等可以使用完整的细胞悬液进行放射受体分析，其主要优点是受体处于接近正常的生理环境中，更能反映受体的生理特性。③组织切片：将冰冻组织或活组织切成厚度为5～50μm的切片，粘贴于涂有明胶的玻片上。其优点是利用放射自显影和放射受体分析可以研究受体分布，也可以进行受体定位、定量分析。
2) 制备过程注意事项：为保证受体标本的生物活性，整个制备过程必须在4℃以下操作；缓冲液应有合适的离子强度、pH、EDTA等浓度；必要时可以添加蛋白酶抑制剂，防止受体蛋白被内源性的蛋白酶水解。

3. 标记配体的要求

1) 高比活度：组织细胞中受体数量一般都很低，在0.01～1pmol/mg蛋白质水平，标记配体比活度高，才能充分与受体反应，提高灵敏度。一般比活度要求在3.7×10^{11} Bq（10Ci）/mmol以上。
2) 高亲和力和特异性：高亲和力和特异性的配体和受体形成复合物稳定，难于解离，交叉反应小，有利于结合与游离配体的分离。不少拮抗剂的亲和力比激动剂的高，因此反应较多。对于有两种以上亚型的受体，还需要注意配体与其他亚型亲和力和特异性，如果目的是检测一种亚型，应只选择对该亚型有高亲和力而对其他亚型亲和力低的标记配体，如果为了测定总的受体结合的位点数，则可以选择对各种亚型都有亲和力的配体。
3) 放射化学纯度要高：RRA中受体位点数和动力学的计算以放射配体和受体结合物放射活度和放射配体比活度为依据，放射性不纯物质可导致计算错误。一般要求的放射化学纯度在95%以上。

4. 非标记配体的选择

非标记配体主要用于测定非特异结合（NSB）。非标记配体可以是标记配体的同一化合物，也可以是受体的另一配体。根据报道，非同一配体效果更好，但必须能与标记配体竞争同一受体。一般非标记配体量是标记配体量的500～1000倍，使绝大多数受体不再与标记配体结合，如此测得的结合部分放射性代表NSB。

5. 结合和游离配体的分离

标记配体和受体结合物是含蛋白质的大分子，游离标记配体是较小分子，采用过滤、离心、吸附、透析、电泳等方式都可以将两者分开。分离过程应该在低温、快速的条件下进行，以免反应平衡被破坏，使复合物的解离降低到最低水平。最常用的方式是过滤和离心法。

二、放射受体分析应用举例

受体测定方法的建立，为疾病发生机制的研究、疾病的辅助诊断、治疗及预后提供了有效的手段，已知外周血白细胞是糖皮质激素作用的靶细胞，存在糖皮质激素受体，以下介绍检测外周血白细胞糖皮质激素受体采用的放射配体结合分析法（乐颖影和李晓文，1999）。

材料与试剂

(1，2，4 ^{3}H)-地塞米松（^{3}H-Dex）

3%葡聚糖（dextran）T 500溶液

红细胞溶解缓冲液：0.155mol/L NH_4Cl，10mmol/L KH_2PO_4，10mmol/L K_2HPO_4，1mmol/L EDTA，pH7.2

均相闪烁液：PPO 7.0g，POPOP 0.4g，萘75g，乙二醇甲醚350ml，二甲苯加至1000ml或PPO 3.0g，POPOP 0.4g，萘110g，二氧六环1000ml

Hank's液 pH7.2，

10mmol/L，pH7.2 PBS

步骤

1）分离白细胞：取静脉血7～8ml，肝素抗凝。用3%葡聚糖T 500溶液促进红细胞凝聚沉降，吸取富含白细胞的血浆层。离心后，再用溶红细胞缓冲液将残存的红细胞溶解去除。白细胞存活率应大于95%，红细胞残存率应小于0.01%。用Hank's液配制成5×10^6个/ml。

2）如欲去除内源性皮质醇，可将白细胞悬液预先于35℃放置15min，待内源性皮质醇-受体复合物解离。用Hank's液洗涤后再将白细胞重悬浮。

3）取1ml 5×10^6个/ml白细胞悬液，加一定浓度的^{3}H-Dex。做Scatchard标图法时，于2～20nmol/L ^{3}H-Dex之间做6或7个浓度；做一点结合分析时，用接近饱和度的^{3}H-Dex 10nmol/L。

4）21℃保温3h，加3ml冷的pH7.2，10mmol/L PBS终止反应。于4℃下3000r/min离心5min，吸弃上清。

5）用漩涡振荡器将细胞沉淀团混匀，用冷的 pH7.2，10mmol/L PBS 洗涤 2 次，去除游离的甾体。

6）于细胞沉淀物内加 98%甲酸 0.1ml，置 60～70℃作用 30～60min，将细胞消化。加入 8ml 均相闪烁液，用闪烁计数器计数 cpm 值。

7）用加相同浓度^{3}H-Dex 和加 2000 倍醋酸地塞米松的平行管的 cpm 为非特异性结合值。总结合 cpm 减去非特异性 cpm 即为特异性 cpm。结果以特异性结合 fmol/细胞数或位点/细胞表示。

第四节　放射免疫实验室的放射性防护

由于放射免疫实验室要使用具有放射性的同位素，而这些放射性物质对环境可能造成污染，对人体可能造成伤害，所以放射免疫室放射免疫试剂的管理，放射免疫分析工作人员的防护，放射性污染和放射性废物的处理就显得尤为重要。以下是放射免疫实验室的一些放射性防护知识（张瑞和延红，2006）。

一、放射性污染的危害

空气污染使工作人员受到外照射，由于污染物质的沉降或被各种表面吸附而形成表面污染，这种污染范围较大，工作人员吸入放射性物质又造成内辐射。表面污染使工作人员受到外照射，当手部污染时用手取食进餐又导致内照射的危害，同位素可以通过无损伤的皮肤进入体内，表面污染转变成空气污染是导致放射性工作人员摄入放射性物质的重要途径，这些放射性物质会变成气溶胶悬浮在空气中，造成更大的危害。

二、放射源的管理

（一）试剂管理

1）每月寄来的放射免疫试剂必须专人登记包装盒的数量，有无破损溢漏，专人负责管理试剂的用量。

2）每天操作人员检测完毕后登记同位素消耗量。

3）每月统计同位素用量和剩余量，并对剩余的同位素进行严格统一的处理。

（二）废物处理

1）废气：主要通过换气扇等排气口排出，确保门窗、走廊的通气性。

2）废水：同位素废液、剩余同位素溶液、沉淀后的上清和洗涤液直接进入单位储藏的衰变池统一处理。

3）作为同位素的固体废物集中收集在标有放射性垃圾的特殊标记的医用红色塑料袋内，存放在特制的铅柜中，10 个半衰期后经过放射性检测达豁免要求后再按一般医用废物深埋处理。

（三）放射免疫分析去污原则

1）要尽早去污，因为污染时间较短的放射性物质容易达到较高的单次去污效率，也可以减少污染的扩大。

2）要配制合适的去污剂。被同位素污染时先用5%硫代硫酸钠或5%亚硫酸钠洗涤，再以10%碘化钾或碘化钠为载体帮助去污；也可以用普通肥皂去污，这时清洗的次数应适当的多一些。

三、放射免疫分析工作人员的个人防护

1）放射免疫实验室通风换气应良好，避免空气中有粉尘，应采用湿式操作的方法，可使污染降到最低。

2）打开放射免疫药盒应有专门的场所，打开标记物瓶盖时要防止标记溶液溢漏出而污染手指，如果手指接触到标记物应立即洗手；如果洒到桌面、地面上，应立即做去污处理。

3）操作完毕应将桌面擦干净，及时检测确定设备、工具表面、工作人员的衣物和手是否有污染，如果污染水平超过相应的导出限应及时采取去污染措施。

4）在有伤口的情况下，不要进行直接接触手的操作，养成良好的操作习惯；在实验室内不得进食、饮水、吸烟；不得进行无关的工作和存放无关的物品；养成良好的个人卫生习惯，离开实验室必须用洗涤液或肥皂反复洗手3～5次。

5）打开标记物的冻干品时需要特别小心，由于冻干品的瓶内呈负压状态，必须采取以下步骤以避免放射性物质的飞溅和溢出：先将瓶塞稍微启开一点，待瓶内外达到大气平衡之后，再打开瓶塞，这样就很安全了。

（苏小平）

参考文献

董宏广，贾娟娟，刘一兵，等. 2007. 胰岛素免疫放射分析方法的建立. 同位素，20（3）：167～170.

乐颖影，李晓文. 1999. 大鼠外周血白细胞糖皮质激素受体的测定. 第一军医大学学报，19（4）：299～301.

张瑞，延红. 2006. 放射免疫实验室的放射性防护. 中国辐射卫生，15（4）：477.

张玉，王凯玉，袁斌，等. 2005. 放射免疫分析法测定重组人白细胞介素-2含量. 中国医院药学杂，25（11）：1019～1020.

Miles LE，Hales CN. 1968. Labelled antibodies and immunological assay systems. Nature，219（5150）：186～189.

Yalow RS，Berson SA. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J Clin Invest，39：1157～1175.

第十四章 免疫酶技术

第一节 概 述

一、免疫酶技术的原理

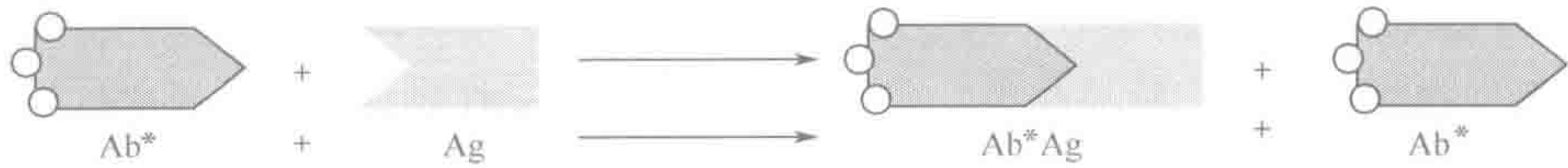
20世纪中期，以放射免疫技术为代表的各种标记免疫技术相继问世，主要原理是将某种可微量或超微量测定的物质（如酶、放射性核素、荧光素、化学发光剂等）标记于抗原（抗体）上制成标记物，加入到抗原（抗体）的反应体系中与相应的抗体（抗原）反应，通过检测标记物的有无及含量而间接反映被检测物的存在与多少。这种将标记技术与抗原抗体反应结合起来的免疫学检测技术以其敏感性高、准确性好、操作简便、易于商品化和自动化等特点逐渐广泛应用于抗原、抗体、补体、免疫细胞、细胞因子等免疫相关物质的检测，也用于酶、微量元素、激素、微量蛋白等体液中各种微量物质的检查。其中，免疫酶技术作为经典的三大标记技术（荧光抗体技术、放射免疫分析和免疫酶技术）之一，在免疫学、医学及其他相关学科的研究中得到最为广泛的应用并不断得以发展。

免疫酶技术是把抗原-抗体的特异性免疫学结合反应与酶的高效催化作用原理有机结合起来的一种方法，即把具有高效催化活性的酶类分子通过化学的方法和抗体（或抗原）结合起来成为酶标记物，而所结合的酶分子并不影响其标记的抗原（或抗体）的免疫反应性，使得酶标记物同时具有免疫反应性和化学反应性，将其与待测的抗原（或抗体）结合后，通过酶的活性降解相应底物呈现出肉眼可见的颜色反应，从而显示出该免疫学反应的存在，达到检测抗原（或抗体）的目的。酶的活性、被降解的底物的多少与最终显色反应的程度呈一定的比例关系，显色越深，说明酶降解底物的量越大，与酶标抗体（或抗原）相结合的对应的待测抗原（或抗体）量也就越多。此技术广泛用于已知或未知抗原、抗体的定性和（或）定量检测，也可用于组织中抗原或抗体的定位研究，即酶免疫组织化学技术（参见第二十七章）。

二、免疫酶技术的分类和命名

免疫酶技术可以分为均相、异相免疫酶标技术，免疫酶标组织化学法和非标记免疫酶技术等。

根据抗原抗体反应后是否需要分离结合的与游离的酶标记物，免疫酶技术又分为均相（homogenous）和异相（heterogenous）两种类型，如果反应后需要分离结合的与未结合的酶标记物并分别检测则为异相法，如果反应后不需要进行分离而直接检测则为均相法。以标记抗体检测标本中的待测抗原为例，通常是在酶标抗体过量的情况下进行，其反应式如下：



Ab* Ag 代表结合了待测抗原的酶标记物，Ab* 为游离的酶标记物。如在抗原抗体反应后，先把 Ab* Ag 与 Ab* 分离，然后测定 Ab* Ag 或 Ab* 中的标记物的量，从而推算出待测标本中的抗原量，这种方法称为异相法。如在抗原抗体反应后 Ab* Ag 中的标记物酶* 失去其特性。例如，酶失去其活力，则不需要进行 Ab* Ag 与 Ab* 的分离，可以直接测定游离的 Ab* 量，从而推算出待测标本中的抗原含量，这种方法称为均相法。

根据反应发生所依托的介质，异相法可以分为液相和固相异相酶免疫测定。抗原和抗体如在液体中反应，有多种分离游离和结合的标记物的方法。目前常用的酶免疫测定法多为固相酶免疫测定，其特点是将抗原或抗体制成固相制剂，这样在与待测标本中抗体或抗原反应后，只需经过对固相介质的洗涤，就可以达到抗原-抗体复合物与其他物质分离的目的，大大简化了操作步骤，如目前的 ELISA 检测技术。免疫酶技术的分类如图 14-1 所示。

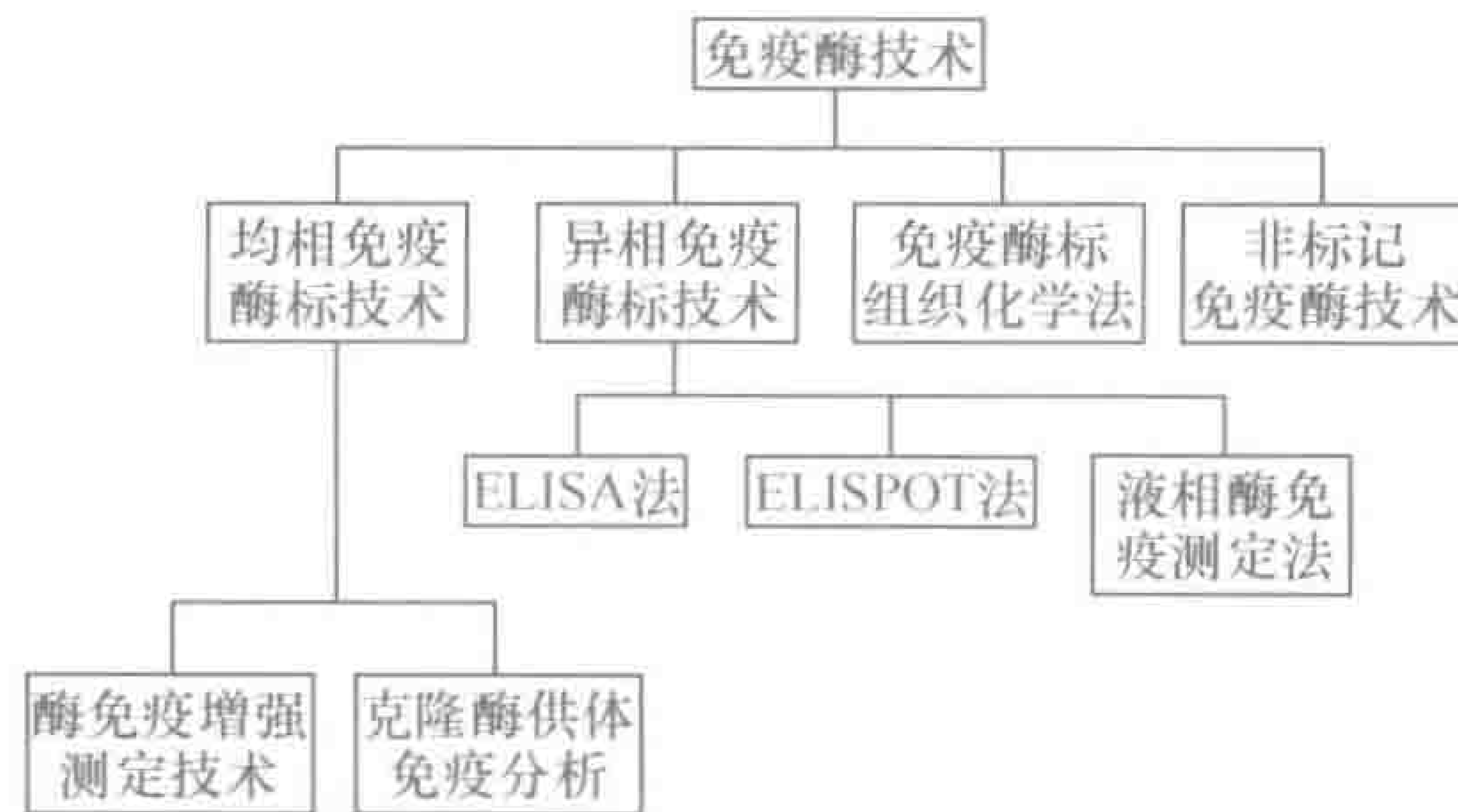


图 14-1　免疫酶技术的分类

三、免疫酶技术的特点

免疫酶技术具有高度的敏感性和特异性，几乎所有的可溶性抗原抗体系统均可用以检测。与放射免疫分析相比，免疫酶技术的优点是标记试剂比较稳定，且无放射性危害。因此，酶免疫测定的应用日新月异，酶免疫测定的新方法、新技术不断发展。其特点主要有：灵敏度高，检测能力可达纳克水平甚至皮克水平；应用范围广，既能检测抗体又能检测抗原，既能定性又能定量、定位，并可用于抗原、抗体的分析；不需要特殊设备；标本可长期保存；酶标记物有效时间较长，一般低温保存可达一年以上。

第二节　标记酶及其底物

一、标记酶及其制备

（一）标记酶的条件

凡对抗体（或抗原）无毒性又具有高催化效率的酶，理论上均可标记抗体（或抗

原）。但根据免疫酶技术的特点，理想的酶也应尽可能符合下列标准：性质稳定，活性高，分解底物的能力强；特异性强，即作用于底物的专一性强；酶与抗原或抗体结合后仍保持其酶活性；该酶较易获得纯制品，有较高的纯度，含杂蛋白较少；与底物作用可以显色；可溶性（水溶性）好，在溶液中稳定；测定方法简单；酶来源方便，且酶相应底物易于保存、制备。

（二）标记酶的质量

衡量酶的质量标准有两条，一是活力；二是纯度，即 *RZ*（Reinheit Zabl 德文）值。

只用酶的单一的活力或纯度来表示酶的质量是不全面的。目前国际上规定，酶的活力以国际单位表示。一个酶单位是指在一定的条件下（pH、温度和底物浓度），1min 能降解 1μmol 底物的酶量，或是转化底物中 1μmol 的有关基团的酶量。1mg 酶所含有的酶的活力数称为比活性。比活性也可以用来度量酶的纯度。

酶的纯度以 *RZ* 值表示。其中 *R* 代表辅基部分的最大吸收光谱，*Z* 代表酶蛋白和其所含有的杂蛋白的最大吸收光谱，二者 OD 值的比值为酶的纯度。$RZ>3$ 为高质量，$3>RZ>2.5$ 为中等质量，$RZ<2.5$ 则表示酶需要纯化。*RZ* 值越小，表示杂蛋白越多。

（三）标记酶的种类及其底物

完全具备各项条件的酶并不多见，目前常用于标记的酶有辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AKP）、β-半乳糖苷酶（β-galactosidase）、葡萄糖氧化酶（glucose oxidase，GOD）、酸性磷酸酶、葡萄糖淀粉酶、乙酰胆碱酯酶等。其 HRP、AKP、GOD 应用比较广泛，现代技术已可生产纯度为 100％的酶，如 HRP 和 AKP 等，它们的催化效率非常高，尤其是 HRP 最为常用，具有活力高、稳定、分子质量小、易提纯等优点。

1. 辣根过氧化物酶

HRP 广泛地分布于植物界，以辣根中含量最高。它是由无色的酶蛋白和棕色的铁卟啉辅基组成的一种糖蛋白，含 18％的中性糖和氨基糖，主要有甘露糖、木糖、阿拉伯糖和己糖胺等。由 300 个氨基酸和 4 个二硫键连接而成，相对分子质量为 40 000，等电点为 5.5～9.0，易溶于水和 58％以下的饱和硫酸铵溶液。HRP 酶蛋白和其所含有的杂蛋白的最大吸收光谱为 275nm，辅基部分的最大吸收光谱为 403nm，二者比值 OD_{403}/OD_{275} 为酶的纯度。$RZ>3$ 为高质量，$3>RZ>2.5$ 为中等质量，$RZ<2.5$ 则需要纯化。用作标记的 HRP 活力一般要大于 250U/mg。

纯 HRP 干燥储存于－20℃可保持稳定，使用 1.36mol/L 甘油、10mmol/L 磷酸钠、30μmol/L 牛血清白蛋白和 20μmol/L 细胞色素 c（pH7.4）溶液作为基质冷冻保存，可使酶结合物稳定数年。HRP 对热及有机溶剂的作用比较稳定，氰化物或硫化物在 10^{-5}～10^{-6}mol/L 浓度时具有可逆性地抑制 HRP 的作用，氟化物、叠氮化合物或羟

胺在高于 10^{-3}mol/L 浓度时抑制 HRP，HRP 还可被羟甲基过氧化氢不可逆地抑制。强酸也是 HRP 的强烈的抑制剂。因此，酶免疫测定常选用上述的某些化合物如氟化钠、叠氮钠和强酸等作为酶反应的终止剂。此外，在配制酶免疫测定的稀释缓冲液时，为防止酶失活，应避免使用叠氮钠作防腐剂。

HRP 的作用底物为 H_2O_2，催化时需供氢体，在供氢体（即色原底物）存在时，HRP 与 H_2O_2 的反应迅速而又专一。30% 的 H_2O_2 并不稳定。作为 HRP 的底物，ELISA 要想得到满意的测定结果，H_2O_2 必须限定在一定的浓度范围内，终浓度通常为 2～6mmol/L。然而在实际研究工作中，研究者一般很少注意这一点。大多数研究者所使用的 H_2O_2 浓度常较理想反应所需的量大 2～4 倍。通常吸附于固相的 HRP 较游离的 HRP 更易受过量 H_2O_2 的抑制，如果 30% H_2O_2 储存液浓度经测定证实确为 30%，则稀释 10 000～12 000 倍常是较为理想的底物。HRP 催化的最适 pH 因供氢体不同而有所差异，但多在 pH5.0 左右。用于 ELISA 的供氢体有下列数种（表 14-1），其中联大茴香胺和邻苯二胺最为常用。但邻苯二胺有致癌作用，使用时需注意。

表 14-1　HRP 用于 ELISA 的供氢体

供氢体	终止剂	终止颜色	测定波长/nm
联大茴香胺(OD)	5mol/L HCl	黄	400
邻苯二胺(OPD)	2mol/L H_2SO_4	橘黄	492
邻苯甲苯胺(OT)	2mol/L H_2SO_4	黄	442
5-氨基水杨酸(5-ASA)	3mol/L NaOH	褐	550
四甲基联苯胺(TMB)	2mol/L H_2SO_4	黄	450

2. 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AKP）可从小牛肠黏膜或大肠杆菌中提取，是一种磷酸脂酶，分子质量约为 80kDa，最适 pH 为 9.0～9.5，性质比较稳定，其作用机制是催化磷酸脂水解释放出无机磷酸而显色，或者通过水解产生的磷酸与钼酸反应生成磷钼酸，然后在还原剂作用下对生成蓝色的产物进行测定。AKP 最初是由 Bulman 等用于标记抗体的。选用不同的底物，可形成不同颜色的终产物。例如，以萘酚（As-Mx）和快蓝（fast blue，FB）为底物，生成蓝色产物。用快红（fast red，FR）代替 FB，形成红色不溶沉淀，与 HRP/4-氯-1-萘酚（CN）或 DAB（3，3′-diaminobenzidine）形成的沉淀形成鲜明对比。

3. 葡萄糖氧化酶

葡萄糖氧化酶（GOD）所催化的底物为葡萄糖，电子供体为对硝基四唑蓝（*p*-nitroblue tetrazolium），终产物为不溶性的蓝色沉淀，比较稳定，不溶于有机溶剂，故易永久保存。在免疫酶标组织化学法的应用中，GOD 从理论上讲较 AKP、HRP 为佳，因为哺乳动物组织内不存在内源性 GOD，但其分子质量较大，为 150kDa，具有较多的氨基，在标记时易形成广泛的聚合，影响酶的活性，故 GOD 主要用于免疫组织化学技术（immunohistochemistry，IHC）的多重标记。

（四）酶标记抗体的制备

1. 酶标抗体的条件

酶标记抗体是指通过化学反应，让酶与抗体形成酶标抗体偶联物，也称为酶标记物（conjugate）。酶标记抗体的方法有多种，常因酶不同而采用不同的方法。常采用的标记方法一般应符合以下要求：技术方法简单、产率高；不影响酶和抗体的生物活性；酶标记物稳定，本身不发生聚合；较少形成酶与酶、抗体与抗体的聚合物。

而对于被标记的抗体来说，也应具有一定的条件：纯度高、含杂蛋白较少，优越性Fab≥IgG≥血清抗体；特异性强，应选择特异性的单价抗体，即抗 IgG 与 IgG 在免疫电泳上只有一条沉淀线，与 IgG 的全血清也只有一条沉淀线；效价高，一般琼脂扩散实验鉴定应大于 1∶64。

对于某些实验来说，可能需要将抗原进行酶标记，基本原理及方法同酶标抗体。

2. 酶标记抗体的制备方法

绝大多数酶是蛋白质，因此，酶对蛋白质抗体的标记，实质上就是两种不同蛋白质之间的交联。大部分交联反应利用蛋白质分子中的 α 氨基和 ε 氨基、亚氨基和巯基的亲核性质，常用的交联方法主要是利用 α 氨基作为交联部位。影响酶与蛋白质之间的交联反应的因素有很多，主要受到蛋白质分子内所具有的适合于偶联的化学功能基团类型和数量的限制。根据交联双方具有的多种不同的反应功能基团可以选用不同的交联剂和交联方法。

A. 交联剂

交联剂有多种，如单功能、双功能和多功能试剂。双功能试剂又可分为同型和异型两类。同型双功能交联剂两端具有相同的活性反应基团，如双亚氨酯、*N*-羟琥珀酰亚胺酯、二硝基氟苯等，其共同特点是都对氨基有专一性，同型双功能交联剂中的戊二醛比较特殊，除与氨基反应外还能与羟基反应，异型双功能交联剂一端与氨基作用，另一端一般与巯基作用，其特点是具有高反应性，但没有专一性。

B. 交联方法

应用同型双功能交联剂戊二醛的交联法和应用过碘酸钠的氧化交联法是最常用的方法，而又以后者为最佳（二者比较见表 14-2），二马来酰亚胺、氟二硝基苯砜、苯醌等方法也可采用。当酶与抗体蛋白用同型双功能试剂进行交联时，常常形成不均一的混合物，既有酶-抗体蛋白的结合物，也有酶-酶、抗体-抗体蛋白自身结合而形成的聚合物同时存在。为克服同型双功能交联剂的这种缺点，可采用异型双功能试剂，其中，目前应用较多的一种是 *N*-琥珀酰亚胺基 3-（2-吡啶基二硫）丙酸酯［*N*-succinimidyl-3-（2-pyridyldithio） propionate，SPDP］，使用 SPDP 可将酶与抗体蛋白通过两者的氨基进行交联，而不会形成酶或蛋白质的自身聚合物。

表 14-2 戊二醛交联法与过碘酸钠法比较

项目	戊二醛交联法		过碘酸钠法
	一步法	二步法	
标记方法	简单	较复杂	较复杂
酶利用率	2%～4%	2%～4%	70%酶偶联到 99%抗体上
产率	＜5%	＜5%	＞50%
标记抗体分子质量	750 万 Da	＜25 万 Da	＞40 万 Da
抗体活性丢失	多	少	较多
酶活性丢失	多	少	较多
染色效应	差	较好	较好

近来，生物素-亲和素系统（biotin-avidin system，BAS）的引用是标记技术的一个重大进展，已用于酶对抗原或抗体以及多种物质的交联标记，它可明显地提高标记效率。利用 BAS 制备的酶标结合物，除具有抗原-抗体专一结合的特点外，还具有生物素-亲和素系统的特异亲和性，因此，结合物也具有高度的专一性，同时也就显著地增加了 ELISA 和 EMIT 等检测方法的测定灵敏度。

Ⅰ. 戊二醛交联法

交联法通常用的交联剂是戊二醛［glutaraldehyde，CHO—$(CH_2)_3$—CHO］。商品化的戊二醛多为 25%的水溶液，利用戊二醛分子上对称的两个醛基，分别与酶和蛋白质分子中游离的氨基、酚基等以共价键结合形成 Schiff 碱（—N ═C—）而进行标记。其反应式如下所示：



$$Ⓔ—NH_2 + HC(=O)—(CH_2)_3—CH(=O) + NH_2—Ⓟ \longrightarrow Ⓔ—N=CH(CH_2)_3CH=N—Ⓟ$$

标记时应尽量采用新鲜纯品，当戊二醛的 $OD_{235}/OD_{280}<3$ 时，即为好的交联剂。戊二醛连接反应是最温和的交联反应之一，可以在 4～40℃温度范围，pH6.0～8.0 的缓冲溶液中进行，分为一步法和二步法。

一步法

一步法即把酶、戊二醛和抗体一起加入进行交联，然后透析出过量的戊二醛而制备出具有高分子质量的酶结合物。此法操作简便，适用于各种酶-抗体系统。但由于不同的抗体和（或）酶所含的氨基数不同，其交联产物不均一，除了形成酶-抗体结合物外，还可以形成酶-酶、抗体-抗体的交联。另外，不同的酶交联效率也不尽相同，HRP 的交联量仅为 6%左右。尤其是当抗体分子质量较大而酶分子质量较小时，抗体分子的氨基数比酶蛋白分子氨基数多得多，更容易生成抗体-戊二醛或抗体-戊二醛-抗体而导致酶标物的活性减小。目前主要应用于 AKP 和 HRP 与抗体的交联。

1）抗 IgG-AKP 的制备。

（1）将 10mg AKP 溶于含有 5mg 抗 IgG 的 1ml PBS（0.01mol/L pH7.0）中，在冰浴中缓缓搅拌，尽量避免气泡产生，直至完全溶解；

（2）缓缓滴加 1%戊二醛溶液 4ml，使戊二醛的最终浓度为 0.2%，移至室温中静

置 2～3h；

(3) 以 0.01mol/L，pH7.0 PBS 液 4℃充分透析或以 Sephadex G25 柱除去过量的戊二醛，4℃保存备用（也可保存于 50%甘油中置低温冰箱）。

2) 抗 IgG-HRP 的制备。

(1) 将 12mg HRP 溶于含 5mg 抗 IgG 的 1ml PBS（0.1mol/L、pH6.8）中；

(2) 缓慢搅拌下加入 1%戊二醛溶液 4ml，置室温 2～3h；

(3) 充分透析或以 Sephadex G25 除去戊二醛，小量分装后保存于低温冰箱，避免反复冻融，或冷冻干燥保存。

二步法

先将酶与戊二醛反应，形成酶-戊二醛结合物，经过透析或层析除去未反应的戊二醛，再将结合有戊二醛的酶分子与抗体分子的氨基结合，最后加入少量的赖氨酸封闭被戊二醛激活的酶的残基。此法酶结合物的质量较均一，产率可提高到 13%。注意事项：AKP 一般不采用二步法，而只用一步法。

1) 将 10mg 的酶溶于 0.2ml 含 1.25%戊二醛的 0.1mol/L、pH6.8 PBS 中室温放置 18h，充分透析或以 Sephadex G25 柱除去未反应的戊二醛。

2) 加生理盐水至 1ml，然后加入 1ml（含 5mg）的抗体溶液和 1ml 1mol/L、pH9.6 碳酸盐缓冲液，混合后 4℃冰箱放置 24h。

3) 加入 0.1ml 0.2mol/L 赖氨酸，室温放置 2h，以 0.15mol/L、pH7.2 PBS 液充分透析，离心去沉淀，上清即为酶结合物。

4) 再进一步以硫酸铵沉淀纯化后应用。

改良二步法

1) 取 HRP 10mg 溶于 0.4ml 0.25mol/L，pH6.8 PBS 液中或 0.05mol/L，pH9.6 碳酸盐缓冲液中。

2) 加入 25%戊二醛 0.1ml，37℃温育 2h。

3) 加入冰冷的分析纯的无水乙醇 2ml，2500r/min 离心沉淀 10～15min，倾去溶液。

4) 沉淀以 80%乙醇 4～5ml 混悬，同上离心，倾去乙醇，将管倒置，使乙醇充分流出。

5) 沉淀用 1ml 0.05mol/L，pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解，加入 0.5～1ml 抗 IgG 抗体溶液（含抗体 15mg 左右），放在冰箱内过夜后，加 KH_2PO_4，使近中性即可应用。

Ⅱ. 氧化交联法

过碘酸钠法

过碘酸钠是强氧化剂，能将 HRP 的甘露糖部分（与酶活性无关的部分）的羟基氧化成醛基，然后与抗体的氨基结合，形成酶标抗体。

1) 将 5mg HRP 溶于新配制的 1ml 0.30mol/L，pH8.1 重碳酸钠溶液中，加 0.1ml 1% 氟二硝基苯（FDNB）无水乙醇溶液，在室温下混合。

2) 再加入 1ml 0.04～0.08mol/L 的过碘酸钠（$NaIO_4$），置室温下轻搅 30min，在溶液呈黄绿色时，加入 1ml 0.16mol/L 的乙二醇溶液，在室温下放置 1h，使氧化反应终止。

3）在4℃条件下对0.10mol/L pH 9.5的重碳酸钠缓冲液透析，换液3次。

4）在3ml HRP-醛基溶液中，加入5mg氢化硼钠（$NaBH_4$），于4℃冰箱放置3h或过夜。

5）用PBS液充分透析，离心去沉淀物，上清即为酶结合物，纯化后使用。

改良过碘酸钠法

为了防止酶蛋白的氨基与醛基发生自身偶联反应，在标记前先用2，4-二硝基氟苯（NDFB）封闭酶蛋白中残存的α氨基和ε氨基，酶与抗体结合反应后，再加入硼氢化钠（$NaHB_4$）还原形成稳定的结合物。

1）取5mg HRP溶于1ml 0.3mol/L、pH8.1的$NaHCO_3$溶液中，加入1%的NDFB无水乙醇溶液0.1ml，室温下轻微搅拌作用1h。

2）加入新配制的0.06mol/L $NaIO_4$水溶液（10ml双蒸水+128mg $NaIO_4$）0.5ml，室温下避光轻微搅拌至混匀，溶液呈黄绿色。

3）取出后加入0.16mol/L乙二醇水溶液（10ml H_2O+0.09ml乙二醇）0.5ml，室温放置或轻微搅拌1h，终止氧化反应。

4）装入透析袋，对0.01mol/L、pH 9.5碳酸盐缓冲液，4℃缓缓搅拌透析6h（或过夜），换液3次。

5）在3ml醛化HRP溶液中加入含5mg纯化抗体的碳酸盐溶液1ml，室温避光下混匀，轻微搅动2～3h，使之充分结合。

6）加入$NaBH_4$溶液（5mg/ml）0.2ml，混匀，置4℃放置3h或过夜。

7）在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀，4℃放置30min，3000r/min离心30min，去上清，沉淀以少许0.02mol/L，pH7.4 PBS液溶解，装入透析袋，以同样液体在4℃透析除盐过夜。

8）次日取出，3000r/min离心30min以除去不溶物（上清也可通过Sephadex G200凝胶柱层析，PBS洗脱），即得酶-抗体（HRP-IgG）结合物，以0.02mol/L，pH7.4 PBS液加至5ml。

9）效价测定合格后，加入BSA至蛋白质浓度为10mg/ml，分装小瓶，低温保存。

二马来酰亚胺法

二马来酰亚胺（dimaleimide）能与蛋白质半胱氨酸的巯基发生反应。首先用α-巯基乙胺还原蛋白质（IgG），并用*N*，*N′*-*O*-苯二马来酰亚胺活化，然后除去多余的试剂，最后使含二马来酰的IgG与含巯基的β-半乳糖苷酶连接。

1）将抗IgG抗体溶于0.1mol/L，pH5.0乙酸钠缓冲液并对同一缓冲液透析平衡过夜。

2）离心除去不溶性物质，抗IgG（7mg/ml）与10ml α-巯基乙胺在37℃温育90min。

3）过Sephadex后浓缩使每毫升含3.0mg左右的还原抗IgG。

4）在0℃条件下，按1∶1滴加饱和*N*，*N′*-*O*-苯二马来酰亚胺溶液，混合后30℃温育20min，过Sephadex G25柱，除去未反应的二马来酰亚胺。

5）收集结合有二马来酰亚胺的抗IgG，调整浓度至OD_{280}=1.0（光径1cm）。

6）取 1ml 溶液加 20μl（5mg/ml）β-半乳糖苷酶，30℃放置 20min，用 0.1mol/L NaOH 中和后，4℃放置 24～72h。

7）过 Sepharose-6B 柱（1.5cm×40cm），以 pH7.0 PBS 洗脱，收集酶结合物，加叠氮钠（NaN_3）防腐，4℃保存备用。

Ⅲ. 异型双功能交联剂 SPDP 制备酶标抗体结合物

上述戊二醛交联剂的缺点是在生成结合物的同时，还不可避免地产生酶-酶和抗体-抗体的自身聚合物，致使结合物产量低，活性也不高。过碘酸钠法制备的结合物活性虽较高，但也有一定的自身聚合物形成，同时由于 Schiff 碱的形成，结合物不稳定，必须用硼氢化钠还原，继而不可避免地会造成抗体和酶活性的丢失，且此法仅限于 HRP。应用异型双功能交联剂 SPDP 制备 HRP-IgG 结合物，可以获得活性较高的酶标抗体结合物简要步骤。

1）5mg HRP 溶于 0.5ml 0.1mol/L PBS（pH7.5）中，迅速滴入一定量[1.065mg SPDP（4mmol）溶于 80ml 无水乙醇]SPDP 液，在 23～25℃轻轻搅拌反应 30min。

2）将反应液通过 Sephadex G25 凝胶柱除去多余的 SPDP 及副产物，平衡及洗脱液均为 0.1mol/L，pH4.5（含 0.1mol/L NaCl）乙酸缓冲液，收集酶蛋白部分（HRP-PDP），必要时进行浓缩。

3）用 SPDP 处理 IgG，基本上与 HRP 的处理步骤相同，仅在用 Sephadex G25 分离时，平衡及洗脱缓冲液是 0.1mol/L，pH7.5 PBS，收集 IgG 部分（IgG-PDP），必要时进行浓缩。

4）取上述 HRP-PDP 溶液，加入固体 DTT（二硫苏糖醇），使其终浓度达到 25mmol/L，在 23～25℃搅拌反应约 25min。

5）反应液过 Sephadex G25 柱，平衡及洗脱缓冲液为 0.1mol/L，pH7.5 PBS，收集酶蛋白部分（HRP-SH），必要时进行浓缩。

6）4℃冰箱中轻微搅拌下放置 20h，反应结束后，将溶液浓缩至 0.5ml，其中产物主要是 HRP-IgG 结合物。

7）用 Sephacryl S200 凝胶，层析柱为 67cm×1.3cm，床体积为 88ml，平衡及洗脱缓冲液均为 0.01mol/L，pH7.5 PBS，收集第一峰，测定各管 OD_{280} 和 OD_{403}，第二峰主要是游离的 HRP，呈浅棕色。

8）在 HRP-IgG 结合物中可能含有少量游离 IgG，需用 ConA-Affi-Gel 柱除去。

注意事项：在上述标记过程中，凡涉及 Sephadex G25 层析步骤时，均可以透析法代替。

3. 酶标抗体结合物的纯化

在酶标记的溶液中，出现的是各种交联物的混合物，有酶-抗体、酶-抗体-酶、抗体-抗体、酶-酶，甚至还有游离状态的酶和抗体。基于实验的要求，除了抗体-酶和酶-抗体-酶结合物以外，其他都应该予以去除。

1）50%饱和硫酸铵沉淀法。用半饱和硫酸铵沉淀 5 次，对 PBS 透析 24h，4℃，换

3 次 PBS，除去硫酸铵（10 000r/min 离心 30min）。此法只能除去游离的酶及酶-酶聚合体，而不能去除其他不需要的成分，但是此法对酶标抗体的损耗较少。

2）过 Sephadex G200 或 Sepharose-6B 柱。此法步骤较为繁琐，而且对酶标抗体的损耗较大，但提纯的质量较好。此法要求 HRP 的 *RZ* 值在 3.0 左右，游离氨基较少，与戊二醛反应后，制成的酶标抗体大部分为单体；而 *RZ* 值小于 2.8 的 HRP，含有较多的游离氨基，与戊二醛反应后，易形成多聚体，使此方法的敏感性下降。

4. 酶标抗体的鉴定

1）酶标抗体的活性鉴定。一般以琼脂扩散和免疫电泳进行鉴定。使酶标抗体和相应的抗原（抗原浓度为 1mg/ml）产生沉淀线，洗涤后于底物溶液中显色，然后再用生理盐水漂洗，沉淀线不褪色，说明酶和抗体都具有活性。良好的酶标结合物琼脂扩散滴度一般应在 1∶16 以上。

2）酶结合物的定量测定（以 HRP 为例）。包括酶量（HRP）、IgG 含量、酶与 IgG 摩尔比值及结合率的测定。

$$酶量（\mu g/ml）=OD_{403}\times 0.42$$

（1）戊二醛法：IgG（mg/ml）=（$OD_{280}-OD_{403}\times 0.42$）$\times 0.94\times 0.62$

（$OD_{403}\times 0.42$ 为酶在 403nm 的吸光度，抗体与酶-戊二醛结合后 OD_{280} 约增加 6%，所以乘以 0.94 校正。由于兔 IgG $OD_{280}=1.0$ 时为 0.62mg，所以又乘以 0.62）。

（2）过碘酸钠法：IgG（mg/ml）=（$OD_{280}-OD_{403}\times 0.3$）$\times 0.62$。摩尔比值=（酶 μg/40 000m）/（IgG mg/160 000ml）=（酶×4）/IgG。（40 000 和 160 000 分别为辣根过氧化物酶和 IgG 的相对分子质量）。

（3）酶结合率=结合物中的酶量/标记时加入的酶量×100%。

（4）酶标记率：OD_{403}/OD_{280}，即酶中正铁血红素辅基的吸光度（403nm）与抗体-酶蛋白中的色氨酸、酪氨酸的吸光度（280nm）之比表示 HRP 在 Ab①中所占的比例，它与 E/Ab 摩尔比值呈高度正相关。

3）酶结合物的质量标准。纯化的酶结合物的质量标准应包括以下几个方面：酶的催化活性、免疫学活性、未连接的游离酶的量、未连接的原始免疫反应物的量、每个酶分子所连接的免疫反应物分子数目、生化性质、酶标记免疫实验效果等。酶结合物的质量差异可引起实验敏感度的变化，如用不同的方法获得的 HRP-IgG 结合物进行酶标记免疫实验，可能得到不同的试验结果，故应予重视，要根据具体的实验要求和目的来选择最佳的制备方法。用于 ELISA 的酶标抗体的各项指标参数如表 14-3所示。

表 14-3　用于 ELISA 的酶标抗体的各项指标参数

评价	最好	好	一般
酶结合量/（mg/ml）	≥1.0	≥0.5	0.4
酶结合率/%	>30	9～10	7
酶/IgG 摩尔比	>1.5	1.0	0.7

5. 酶标抗体的保存

分装小瓶，冻干低温保存。也可分装小瓶，在 4℃或 0℃以下保存。加甘油或牛血清白蛋白（最后浓度为 33%）保存更好。应尽量避免反复冻融。保存期一般可以达到 1～2 年活性不变。

二、抗酶抗体及酶-抗酶复合物的制备

利用化学反应进行酶结合物的制备，将不同程度地影响酶和抗体的生物活性。如以酶作为抗原与其相应抗体（抗酶抗体）形成的免疫复合物代替酶标记物，就可提高酶免疫方法的灵敏度，减少化学偶联反应对酶和抗体活性的影响。酶和抗酶抗体不用任何化学交联剂处理就可特异性结合，抗体的失活少，在酶-抗酶抗体复合物形成后，同时就具有酶的活性，遇到相应的底物即呈现催化显色作用。因此 HRP-抗 HRP（PAP）、AP-抗 AP（APAAP）已广泛用于免疫酶技术中。近些年来又有人将双特异性抗体或杂交抗体用于酶免疫技术中，使酶免疫方法操作更加简便，特异性与灵敏性也大大提高。需要注意的是，抗酶抗体必须用与第一抗体同种来源的动物制备。

（一）酶-抗酶复合物的制备

将 HRP 与其特异性的抗体相结合制成复合物（peroxidase-antiperoxidase，PAP 复合物）来替代此前采用化学交联法形成的酶-抗体复合物，所利用的是抗原-抗体特异性反应的原理，其中 HRP 作为抗原，此法由于没有使用任何化学交联剂，酶的活性以及抗体的活力均得到很好的保持，从而能够提高免疫酶检测技术的灵敏度。操作步骤如下。

1）取兔抗 HRP 血清 10ml，4℃下 1.5×10^4 r/min 离心 20min，分离上清和沉淀物分别进入下一操作步骤。

2）在上清中滴加 HRP 溶液（0.5mg/ml）直至不再产生沉淀，室温下静置 1h，1.5×10^4 r/min 离心 20min，将沉淀物用 4℃生理盐水 125ml 洗 3 次，每次洗涤后 1.5×10^4 r/min 离心 20min。

3）冰浴下将沉淀物混悬于过量的 4ml HRP（2mg/ml）溶液中。

4）在 pH 计的监测下，边搅拌边加入 0.1mol/L 或 0.01mol/L HCl 调节 pH 至 2.3，并确定此时沉淀已全部溶解，溶液变清，1.5×10^4 r/min 离心 20min。

5）吸取上清，立即用 0.1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.4，1.5×10^4 r/min 离心 20min，去除沉淀物。

6）测量体积后加入 1/10 容量的 0.075mol/L 乙酸钠和 0.15mol/L 乙酸铵的等量混合液，搅拌混匀。

7）边搅拌边逐滴加入等体积的 100%饱和硫酸铵，并持续 20min（最好在 4℃条件下），1.5×10^4 r/min 离心 20min。

8）将沉淀物用 50%饱和硫酸铵洗 2 次，同上离心。

9）将沉淀物混悬于 5ml 蒸馏水中，4℃条件下对 pH6.75 乙酸盐缓冲液透析 3d，每天换液 1 或 2 次（缓冲液由 1.35×10^4 ml 生理盐水、25ml 1.5mol/L 乙酸钠和 75ml 2mol/L 乙酸铵配成）。

10）4℃下 1.5×10^4 r/min 离心 20min，吸取上清，于 OD_{280} 和 OD_{403} 测定，计算 IgG 和酶含量及摩尔比值（具体方法参见上述“酶结合物的定量测定”）。

11）小量分装，−20℃保存。

12）使用时从低温冰箱中取出后立即在 37℃水浴中融化。

13）如采用单克隆抗 HRP 抗体（抗 HRP McAb），上述操作步骤可以简化，不需严格的条件限制，置 37℃水浴反应 2h 即可，通常以按 HRP/IgG 的摩尔比为 4∶1 较为合适，既节约了 HRP 的用量，也可保证 PAP 复合物的效力，但对于抗 HRP McAb 的要求较高，其中 IgG 含量要高，与 HRP 有较强的结合力，并且结合后不会影响酶的催化活力。

（二）碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶复合物的制备

碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶复合物（APAAP）的制备方法基本同 PAP，即先将 AP 加入抗 AP 的抗血清或单抗中获得免疫沉淀物，再加入含过量的酶的缓冲盐溶液中，使免疫沉淀物解离，调整 pH 至 2.3 后立即中和，除去不溶解的沉淀物，加入半饱和硫酸铵，纯化 APAAP。但常规的制备免疫血清的方法很难制备针对 AP 抗原的抗血清，从而难以符合 APAAP 技术的要求，而现在已有商品化的小鼠、大鼠、豚鼠、山羊、绵羊和兔 PAP、APAAP 供应，非常方便研究者的使用，根据需要还可将 PAP 和 APAAP 先与相应桥抗体结合后，再与特定单抗组成完整的复合物用于实验检测。

第三节　异相免疫酶标技术

根据抗原抗体反应后是否需要分离结合的与游离的酶标记物，酶免疫测定可分为均相和异相两种类型。相对于均相免疫酶标技术，异相免疫酶标技术在医学检验中的应用更为广泛，其反应过程需经过结合标记物和游离标记物的分离才能进行测定。异相免疫酶标技术根据反应发生所依托的介质又可以分为液相和固相异相酶免疫测定。目前应用最为广泛的是 Engvall 和 Perimann 于 20 世纪 70 年代初首先建立的酶联免疫吸附法即 ELISA 法，其已成为固相酶免疫测定的代名词。

一、异相酶免疫测定方法

异相酶免疫测定是指在液相中进行的酶标抗体（抗原）与相应抗原（抗体）反应后，需要加入分离试剂将游离的酶标记物分离出来，然后再进行底物显色反应，区别于均相酶免疫测定中直接测定结果，无需分离步骤。常用的标记酶和底物同前所述。

二、酶联免疫吸附测定法

目前应用最多的免疫酶技术是 ELISA，将已知抗体或抗原结合在某种固相载体上，并保持其免疫活性，测定时将待检标本和酶标抗体或酶标抗原按不同步骤与固相载体表面吸附的抗体或抗原发生反应，用洗涤的方法分离抗原-抗体复合物和其他的游离物成分，结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例，然后加入底物显

色，有色产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据颜色反应的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高，故可极大地放大反应效果，从而使测定方法达到很高的敏感度。ELISA 法可用于检测抗体，也可用于检测抗原。根据检测目的和操作步骤的不同，通常有 3 种类型的检测方法，即间接法、夹心法及竞争法。

ELISA 法常用的酶有辣根过氧化物酶（HRP）和碱性磷酸酶（AKP），相应的底物分别是邻苯二胺（OPD）和对硝基苯磷酸盐，前者呈色反应为棕黄色，后者为蓝色。可用目测定性，也可用酶标仪测定 OD 值以直接或间接反映待测抗原（抗体）的含量。

（一）ELISA 法的分类

1. 间接法

此法是检测抗体最常用的方法。将已知抗原吸附于固相载体上，加入待测血清（抗体）与之结合，洗涤去除未结合的游离抗体后，加酶标抗体（抗抗体）和底物进行测定，有色产物的量与抗体的量成正比。其原理如图 14-2 所示。

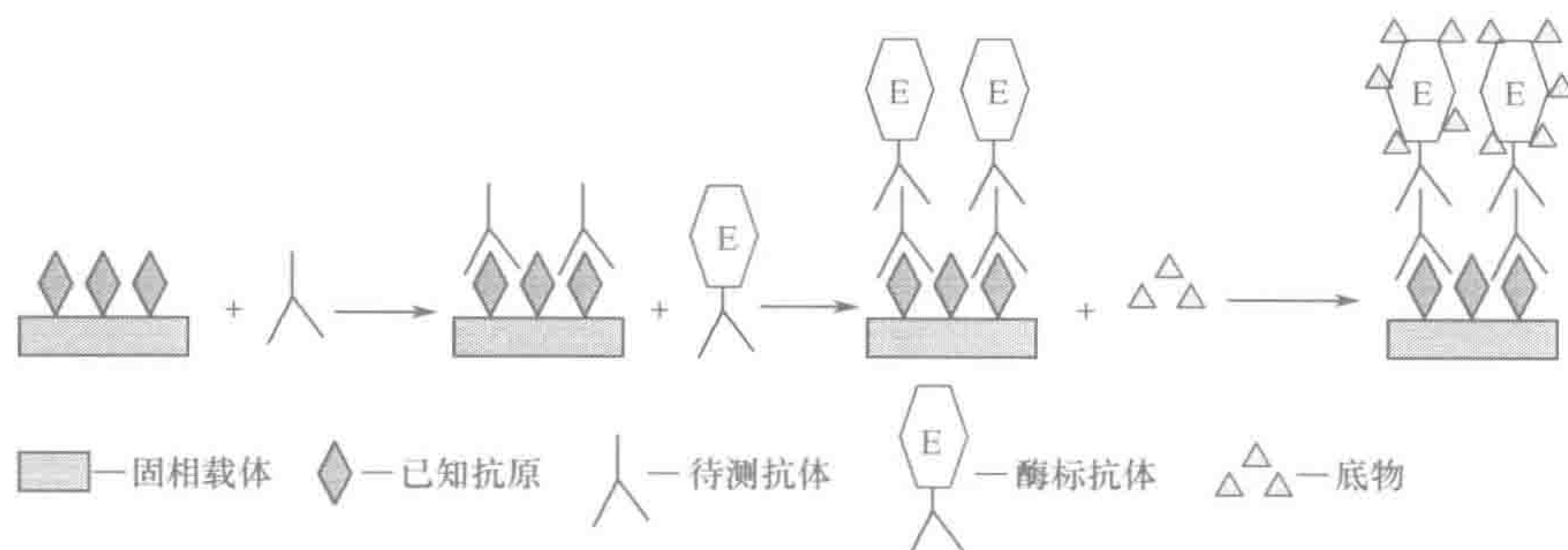


图 14-2　ELISA 间接法检测抗体原理示意图

2. 双抗体夹心法

此法常用于检测抗原。将已知抗体吸附于固相载体，加入待测标本（含相应抗原）与之结合，温育后洗涤，加入酶标抗体及底物溶液进行测定（图 14-3）。

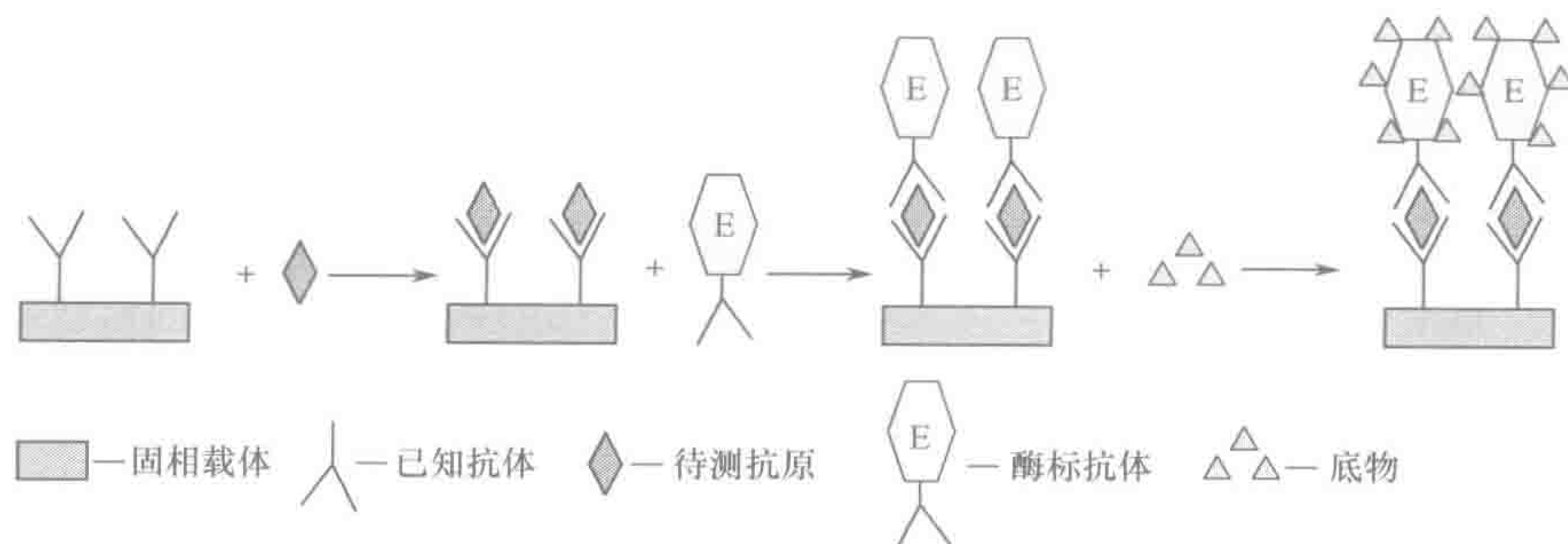


图 14-3　ELISA 双抗体夹心法检测抗原原理示意图

3. 竞争法

此法可用于抗原及半抗原的定量测定，也可用于测定抗体。以测定抗原为例，将特异性抗体吸附于固相载体上，加入待测抗原和一定量的已知酶标抗原，使二者竞争地与固相载体上的特异性抗体结合，经过充分的洗涤分离，最后结合于固相载体上的酶标抗原与待测抗原含量呈负相关（图 14-4）。

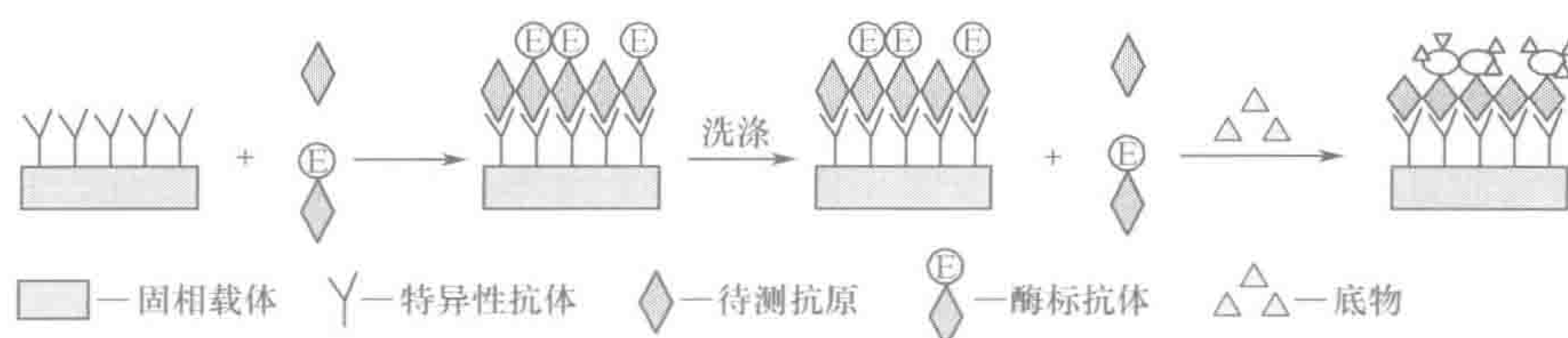


图 14-4　ELISA 竞争法检测抗原原理示意图

（二）ELISA 条件的选择

1. 固相载体的选择

能够作为固相载体的原料种类很多，其中包括纤维素、交联右旋糖苷、葡萄球菌聚苯乙烯、聚丙烯酰胺等。目前最常用的固相载体是聚苯乙烯，其制成的多孔（40 孔或 96 孔凹孔板，也称为酶标板）微量滴定板吸附蛋白质的性能好，对抗原或抗体的免疫活性影响较小，且价格便宜、操作简便。

新的酶标板一般不需处理，用双蒸水冲洗即可应用。理论上每块酶标板均应用一次即废，但不少实验工作者认为用超声波处理，清洁液 Triton X-100、20%乙二醇处理仍可应用。如发现空白对照孔显色较深和（或）阳性样品显色结果不理想时，应弃去不用。

2. 固相载体的吸附条件

固相载体的吸附多为物理吸附，与其结合的抗原或抗体称为免疫吸附剂。吸附的多少取决于 pH、温度、蛋白质浓度、离子强度，以及吸附时间等。

较好的吸附条件是：离子强度为 0.05～0.10mol/L、pH9.0～9.6 的碳酸盐缓冲液作为抗原或抗体的稀释液，蛋白质浓度为 1～100μg/ml，4℃过夜或 37℃ 3h。

3. 酶标抗体使用浓度的确定

聚苯乙烯微量滴定板孔中加入过量的抗体包被，温育一定时间，冲洗，把酶标结合物做系列倍比稀释，每个稀释度加两孔，温育、冲洗，再加底物显色、比色。以 OD 值为纵坐标、酶标结合物的稀释度为横坐标，制作曲线。找出 OD 值为 1 时，相对应的酶标抗体稀释度即为最适的酶标抗体稀释度，但此最适稀释度仅限于这个条件，如条件变换则不一定是最适。如 1∶400 的酶标抗体稀释度温育 6h 可与 1∶6400 稀释度温育 24h 得到相同的结果。所以实验条件一旦确定，最好不要随意变更，以保证结果的重复性和相对准确性。得到的最适酶标抗体稀释度也可作为工作浓度，或可提高半个至一个滴度作为工作浓度，但不能提高过多，否则非特异性显色将增加，影响结果的判定。

酶标抗体的滴度能够反映酶标抗体的质量，并间接反映酶标结合物的优劣。有报道认为 1：320 滴度为合格，1：1000 以上更好。酶标抗体滴度越高，敏感性就越高，用于工作浓度的稀释倍数就越大，非特异性反应就越低。

4. 包被抗原

A. 抗原的要求

用于 ELISA 的抗原必须采用纯度较高的抗原，如果含有其他杂质，将有可能与抗原共同竞争固相载体上有限的结合位置。并非所有的抗原都能适用于 ELISA 实验，必须经过预实验证实该抗原能牢固地吸附于固相载体上而不丧失其免疫学活性，且可以得到有规律的可重复的结果，在吸附固相载体后，对加入的各种试剂不产生或产生最小限度的非特异性吸附。

B. 抗原效价的测定

可采用单方阵或双方阵实验。①单方阵实验：以不同稀释度的抗原包被酶标板，加入常规的 1：200 倍稀释的阳性血清，再加入酶标抗体，显色，测 OD 值，以 OD 值为 1.0 时相应的抗原浓度作为使用效价；②双方阵实验比较精确，它既能测出抗原的最适浓度又能测出抗体的最适浓度，即将抗原抗体均稀释成不同的浓度进行酶标抗体反应，以血清稀释倍数最高的阴性、阳性血清的 OD 值差最大时所对应的抗原稀释度为抗原的使用效价。已吸附抗原的固相载体经冻干或干燥保存很稳定，可保持数月仍不失活。

5. 包被抗体

抗体效价的测定同抗原，采用单方阵或双方阵实验。

6. 清洗液

一般采用 0.01mol/L、pH7.2 PBS Tween 缓冲液。Tween 是聚氧乙烯去水山梨醇脂肪酸酯，为非离子型的表面张力物质，常作为助溶剂，其编号依聚合山梨醇所结合的脂肪酸种类不同而定。Tween 20 是结合月桂酸、Tween 40 是结合棕榈酸、Tween 60 是结合硬脂酸、Tween 80 是结合油酸等。通常以 Tween 20 加入缓冲液或含 1%牛血清白蛋白（或 10%小牛血清或卵清蛋白）的 PBS 缓冲液作为酶标板的湿润剂，以减少非特异性吸附。特别是在抗原包被以后，以牛血清白蛋白缓冲液再包被一次而占据孔内剩余的结合位置，能够更大程度地减少非特异性反应。

7. 反应时间

抗原与抗体、抗体与酶标抗体反应一般在 37℃ 2～3h 达到高峰。如果时间太短，敏感性下降；时间太长，吸附的抗原或复合物可能脱落。酶底物反应时间一般采用15～30min，最长不超过 45min。也可以标准阳性血清为准，随时测定其 OD 值，当达到规定的 OD 值时，即终止反应，但此法较为繁琐，一般不采用。

（三）ELISA 结果判定及表示法

结果判定分目测法和比色法。结果表示有以下几种。①以“+”、“-”表示阳性或阴性，通常用作定性或半定量；②酶标仪测定光吸收值，直接用 OD 值表示，此法目前最为常用；③用终点滴度表示，即将标本连续稀释，以最高稀释度的阳性反应为该标本

滴度；④以单位表示，将已知阳性血清做不同稀释进行滴定，以阳性血清的单位数为横坐标、以相对应的 OD 值为纵坐标，绘制标准曲线。未知样品可根据其 OD 值从标准曲线上找出单位数，再乘以稀释倍数，即可获得未知样品的单位数。

（四）ELISA 实验方法

间接法检测特异性抗体

材料与试剂

抗原包被液：Na_2CO_3 1.59g，$NaHCO_3$ 2.93g，NaN_3 0.2g，加 H_2O 至 1000ml，充分混悬，密封盖好，4℃保存

PBS

PBSN：含 0.05 %（质量体积比）NaN_3 PBS

封闭缓冲液：BBS（硼酸盐缓冲液，0.015mol/L $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$，0.12mol/L NaCl，以 NaOH 调 pH 至 8.5）中包含：0.05 % Tween 20，1mmol/L EDTA，0.25 %（体积比）BSA，0.05 %（质量体积比）NaN_3，于 4℃保存

待检抗体

待检抗体稀释液：NaCl 8g，KH_2PO_4 0.2g，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g，Tween 20 0.5ml，加蒸馏水至 1000ml，4℃保存

酶标抗体：辣根过氧化物酶标记的抗抗体（根据需要选择商品化的产品）

洗涤液［HBSS，1%（质量体积比）牛血清白蛋白，0.1%（质量体积比）NaN_3］

HBSS 溶液（Hanks 平衡液）：0.40g KCl（终浓度 5.4mmol/L），0.09g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度 0.3mmol/L），0.06g KH_2PO_4（终浓度 0.4mmol/L），0.35g NaH_2PO_4（终浓度 4.2mmol/L），0.14g $CaCl_2$（终浓度 1.3mmol/L），0.10g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（终浓度 0.5mmol/L），0.10g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度 0.3mmol/L），8.0g NaCl（终浓度 137mmol/L），1.0g D-葡萄糖（终浓度 5.6mmol/L），0.2g 酚红（0.02%，选用），加水至 1L，以 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.4，过滤，4℃密闭保存 1 个月

底物溶液 A：10mg TMB+2ml DMSO，取 200μl 加入 10ml pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中，pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液：0.1mol/L 柠檬酸（21.014g/100ml）24.3ml，0.2mol/L Na_2HPO_4（28.4g/L）25.7ml，H_2O 50ml，4℃保存

底物溶液 B：30% H_2O_2

终止液：2mol/L H_2SO_4

多道移液管

一次性吸头

96 孔微量滴定板

塑料冲洗瓶

酶标仪：配有 405nm 滤光片的分光光度计、配有 365nm 激发滤光片或 450nm 发射滤光片的荧光分光计

步骤

1）根据预实验选定最适的酶标抗体稀释度。

2）确定抗原包被液终浓度。用 PBSN 配制这种终浓度抗原溶液（纯抗原溶液通常为 0.2～10.0μg/ml 或≤2μg/ml）。抗原应占全部蛋白质的 3% 以上，全部蛋白质浓度应小于 10μg/ml。每块 96 孔微量滴定板大约需 6ml 抗原溶液。

3）在微量滴定板每孔中加入 50μl 抗原包被溶液，并将每个孔中的抗原溶液振荡混匀，使其完全覆盖孔底。用塑料盖封盖滴定板，室温下孵育过夜或 37℃下孵育 2h。封盖的滴定板在 4℃下可以保存数月。

4）弃去抗原包被液，PBS 充分洗涤滴定板的各包被孔，弃去洗涤液，重复 2 或 3 次。

5）将封闭缓冲液 200μl/孔加入各包被孔内，室温下孵育 30min，用 PBS 洗涤滴定板 3 次，每次洗涤后倒扣于吸水纸上拍干。

6）在每个包被孔内加入 50μl 用待测抗体稀释液稀释的待测抗体标本溶液。盖封定板，室温下孵育≥2h。

7）弃去孔中液体，用洗液洗涤滴定板 3 次。

8）每孔中加入 50μl 含酶标抗体的封闭缓冲液［步骤 1）中选定的最适浓度］。盖封滴定板，室温下孵育≥2h。按步骤 7）洗涤滴定板。如实验需要，在加底物前滴定板可于 4℃条件下保存数月。

9）洗液洗涤滴定板 3 次，弃去孔中液体。

10）将底物溶液 A 与底物溶液 B 以 43∶7 比例混合，每孔中加入 50μl 混合液，室温下避光孵育 15～30min。加入 25μl 终止液终止反应。

11）酶标仪检测 OD 值，根据标准曲线计算待测抗原量。

注意事项

确定抗原包被液终浓度时，同一种抗原在不同的 pH 下包被效率不同。

双抗体夹心法检测抗原

材料与试剂

酶标抗体：HRP 标记的抗抗体（根据需要选择商品化的产品）

抗原包被液

PBS

PBSN：含 0.05%（质量体积比）NaN_3的 PBS

封闭缓冲液

待检抗体标本溶液

底物溶液 A、B

洗涤液

终止液：2mol/L H_2SO_4

多道移液管，一次性吸头

96 孔微量滴定板

塑料冲洗瓶

酶标仪：配有 405nm 滤光片的分光光度计、配有 365nm 激发滤光片或 450nm 发射滤光片的荧光分光计

特异性抗体（单克隆或多克隆）或抗血清中的免疫球蛋白部分

步骤

1）用 PBSN 稀释特异性抗体或免疫球蛋白部分，配制捕获抗体溶液（最终浓度 0.2～10μg/ml）。

2）确定待检测抗原浓度所需的捕获抗体和结合物的浓度，用 PBSN 配制此浓度的捕获抗体溶液。

3）用 50μl 捕获抗体溶液包被微量滴定板，并封闭［参见间接法检测特异性抗体，步骤 3）～5）］。

4）用封闭缓冲液按 1∶3（体积比）倍比稀释同源抗原，配制标准抗原的系列稀释溶液。选用结合动态范围（15%～85%，总范围是 0.1～1000ng 抗原/ml）的稀释液。

5）用封闭缓冲液配制待测抗原溶液稀释液（通常是 1～100ng 抗原/ml）。根据具体的实验需要，待测抗原溶液可能需要稀释，但要确保至少一个稀释度下的抗原能够精确测定。

6）抗体包被孔中加入 50μl 待测抗原溶液和标准抗原稀释液，室温下孵育≥2h。

7）用 PBS 洗涤滴定板 3 次。将封闭缓冲液注入每个孔中，室温下孵育 10min。用 PBS 洗涤 3 次去除残留液。

8）加入 50μl 特异 HRP 标记抗体（通常是 25～400ng 特异抗体/ml），室温下孵育 2h。

9）洗液洗涤滴定板 3 次，弃去孔中液体。

10）将底物溶液 A 与底物溶液 B 以 43∶7 比例混合，每孔中加入 50μl 混合液，室温下避光孵育 15～30min。加入 25μl 终止液终止反应。

11）酶标仪检测 OD 值。

12）绘制基于标准抗原溶液连续稀释数据的标准曲线。抗原浓度对数值为 x 轴、荧光度或吸光度为 y 轴，在标准曲线中求出待测溶液中抗原浓度。

注意事项

1）最好做 2 或 3 遍标准曲线以确保可精确定性测量。

2）快速加入样品，以最大限度减少由于孔数较多而造成的孵育时间不同所带来的误差。

竞争法检测抗原

材料与试剂

HRP 标记的特异性抗体

标准抗原溶液

待测抗原溶液：0.2～10μg 抗原/ml，纯化或部分纯化，用 PBSN 配制，4℃保存

圆形底微量滴定板

步骤

1）分别确定包被试剂和 HRP 标记抗体的最适浓度。用封闭缓冲液稀释碱性磷酸酶标记的特异抗体，配制浓度为最适浓度（通常为 25～500ng 抗体/ml）2 倍（2×）的结合物溶液。每个滴定板约需 3ml 碱性磷酸酶标记抗体溶液。

2）用 50μl 标准抗原溶液包被微量滴定板孔，并封闭［参见间接法检测特异性抗体，步骤 3)～5)］。

3）为了绘制标准抑制曲线［步骤 10)］，用封闭缓冲液对标准抗原溶液作连续 6 次 1∶3（体积比）的稀释。应使用抑制作用动态范围大（15%～85%，通常是1～250ng/ml）的若干稀释度，每个滴定板每个稀释度需 75μl 以上。

4）圆形底微量滴定板每孔中加入 75μl 2×结合物溶液，然后加入 75μl 抑制剂［步骤 3）中待测抗原溶液或者是标准抗原溶液］，均匀混合后室温下孵育≥30min。根据实验的需要，有可能需要测定待测溶液的 2 或 3 份稀释液，以期在 15%～85%范围内产生抑制作用。

5）转移 50μl 结合物与抑制剂的混合液或对照样本到抗原包被的滴定板上［步骤 2)］。对照样本放在第 11 列；单纯底物溶液（无结合物）放在第 12 列，室温下孵育 2h。

6）洗涤滴定板［参见间接法，步骤 7)］，将底物溶液 A 与底物溶液 B 以 43∶7 的比例混合，每孔中加入 50μl 混合液，室温下避光孵育 15～30min。加入 25μl 终止液终止反应。

7）酶标仪精确测量抑制作用。

8）基于标准抗原溶液稀释液抑制作用绘制标准抗原-抑制曲线，抗原浓度对数值为 x 轴，荧光度或吸光度为 y 轴。

9）在标准抗原抑制曲线中求出待测溶液中抗原浓度。

注意事项

1）抑制作用动态范围通常以经验确定，抗原浓度一般在毫摩尔（10^{-6} mol/L）和皮摩尔（10^{-12} mol/L）范围内变动。对于大多数蛋白质抗原，初始浓度应在 10μg/ml 左右，用封闭缓冲液以 1∶4（体积比）连续稀释多次，在标准检测条件下检测这些抗原稀释液抑制结合物与抗原包被滴定板结合的能力。

2）标准抗原-抑制曲线线性偏差表明特异性抗体是异质性的，有明显不同的亲和力，或可能是配制的标准抗原溶液含异质性抗原。

第四节　酶联免疫斑点检测法

酶联免疫斑点检测（enzyme-linked immunospot assay，ELISPOT）结合了细胞培养技术与 ELISA 技术，能够在单细胞水平检测细胞因子的分泌情况。其技术原理是用抗体捕获培养中细胞所分泌的细胞因子，并以酶联斑点显色方式将其表现出来。

该技术检测细胞因子具有三大优点：①灵敏度高。可以达到 1/1 000 000，是目前为止最灵敏的检测技术之一，灵敏度比传统的 ELISA 方法高 2 或 3 个数量级。②单细胞水平的活细胞功能检测。ELISPOT 检测的是活细胞的单个细胞的分泌情况，而非细胞群体的平均分泌。③操作简便经济，并可以进行高通量筛选。ELISPOT 无须复杂的体外细胞扩增过程，避免了同位素的使用，不需大型的、专门的实验仪器设备，按照标准化的实验操作，一个实验者可以同时处理多个样品，可以广泛应用于临床试验或临床检验的高通量操作中。

此技术操作在 96 孔培养板上进行，直接以培养板的塑料板底或 PVDF 膜以及硝酸纤维素膜为基质，包被上特异性单克隆抗体（由于涉及细胞培养过程，对单克隆抗体的要求要远高于 ELISA 中的捕获抗体，该抗体需无毒、不含内毒素、亲和力高等特点），用以捕获细胞分泌的细胞因子。之后，在孔内加入待检测细胞及抗原刺激物进行培养。在特异性抗原或非特异性有丝分裂原的刺激下，数小时之内，细胞就开始分泌各种细胞因子。细胞因子当即就被位于细胞下方膜上的单克隆抗体所捕获。洗去细胞后，被捕获的细胞因子可以与生物素标记的第二抗体结合，然后用酶标亲和素与生物素结合，进行化学酶联显色，可以在膜的局部形成一个个圆形斑点。每一个斑点对应分泌细胞因子的一个细胞，这些细胞被称为斑点形成细胞（spot forming cell，SFC）。统计膜上斑点数目，除以当初加入孔内的细胞总数，可计算出阳性细胞的频率（图 14-5，见书后彩图）。



图 14-5　ELISPOT 反应原理示意图

一、单色 ELISPOT 法检测分泌细胞因子的细胞

材料与试剂

纯化的细胞因子特异性抗体

包被缓冲液。A 液：8.4g $NaHCO_3$/100ml H_2O（终浓度 1mol/L），B 液：10.6g Na_2CO_3/100ml H_2O（终浓度 1mol/L），取 45.3ml A 液与 18.2ml B 液混合，并加水补足至 1L。根据实际需要，用 A 液或 B 液调 pH 至 9.6，室温保存

洗液：含 0.25% Tween 20 的 PBS 溶液

阻断缓冲液：含 5%BSA 或 FCS 的 PBS 溶液

RPMI-10 完全培养基（或其他适宜培养基）

分泌细胞因子的细胞（小鼠或人的）

丝裂原，抗原或其他促细胞因子分泌的刺激物

带有标记物的细胞因子特异性二抗

稀释缓冲液：含 1% BSA 的 PBS 溶液

适用于所检测细胞类型的检测抗体或蛋白质：AKP 或 HRP 偶联的链亲和素或羊抗兔 IgG

PBS 溶液

BCIP/NBT 溶液：混匀 33μl NBT 储存液（100mg NET 溶解于 2ml 的 70% DMF 中，4℃下可保存 1 年）和 5ml 碱性磷酸酶底物缓冲液，再加入 17μl BCIP 储存液（100mg BCIP 溶解于 2ml 的 70% DMF 中，4℃下可保存 1 年），混匀（室温下可稳定 1h）

氨乙基咔唑（aminoethylcarbazole，AEC）溶液：在 200μl *N′*,*N*-双甲基甲酰胺溶解 2.5mg 氨乙基咔唑（AEC），加 9ml 0.05mol/L，pH5.0 乙酸钠和 4μl 30 %（体积比）H_2O_2，0.2μm 滤膜过滤除菌，使用前新鲜配制

96 孔硝酸纤维素膜板

37℃，5%CO_2 孵箱

解剖显微镜，10×或 30×放大倍数

ELISPOT 自动分析仪

步骤

1）加入 50μl 含有细胞因子特异性一抗的包被缓冲液至微孔板。封盖。常温下孵育 2h 或 4℃孵育过夜。

2）弃去包被抗体液。洗液洗涤 3 次（200μl/次/孔）。最后一次用力甩掉孔中的洗液，倒置在灭菌的吸水纸上拍干。

3）每孔加入 200μl 阻断液，37℃孵育 30min。

4）弃去阻断液。洗液洗涤 3 次（200μl/次/孔）。最后一次用力甩掉孔中的洗液，倒置在灭菌的吸水纸上拍干。

5）每孔加入 100μl RPMI-10 完全培养基，室温孵育 10min，弃去孔中的液体并倒

置在灭菌的吸水纸上拍干。

6）选取另外一块微孔板，用 RPMI-10 完全培养基准备 2～4 倍稀释浓度的细胞悬液，从细胞板向包被板的每孔加入总量≤100μl 的单细胞悬液，起始细胞数为 10^5 个/孔或 10^6 个/孔。每个实验条件设立 3 或 4 个复孔。最好设立一个已知分泌待测细胞因子的细胞系作为阳性对照。

7）向细胞孔中加入丝裂原、抗体或其他相应的刺激物。未刺激的细胞（只有培养基）作为背景对照及体内激活的对照。

8）将细胞置于 37℃，5% CO_2 培养箱中水平放置孵育 6～24h。

9）每孔用 200μl 洗液充分洗涤 10 次以完全移除细胞。最后一次用冰的双蒸水洗涤裂解残存的细胞。洗涤完后，用力甩掉孔中的液体，倒置在灭菌的吸水纸上拍干。

10）每孔加入 50μl 含标记的细胞因子特异性二抗的稀释缓冲液。37℃孵育 2h。

11）弃去二抗缓冲液。洗液洗涤 6 次（200 μl/次/孔）。最后用力甩掉孔中的液体，倒置在灭菌的吸水纸上拍干。

12）每孔加入 50μl AP-或 HRP-偶联的检测抗体或蛋白质（如亲和素、链亲和素或羊抗兔 IgG），37℃孵育 2h。

13）洗液洗涤 6 次（200μl/次/孔）并拍干。最后再用 PBS 洗涤一次并拍干。

14）每孔加入 50μl BCIP/NBT 溶液（相对于 AKP）或 50μl AEC 溶液（相对于 HRP），37℃孵育 5～30min，直至看到有蓝色斑点（AKP）或红褐色斑点（HRP）形成。

15）每孔用 200μl 双蒸水洗涤 3 遍，自然风干。用 10×或 30×放大倍数的解剖显微镜计数斑点，或采用 ELISPOT 自动分析仪进行计数和分析。

注意事项

1）最佳包被抗体的浓度应做预实验设定。不同的 ELISPOT 检测其包被条件可能不同。包被抗体的浓度通常是常规 ELISA 所用浓度的 5～10 倍（如 5～10μg/ml）。抗体通常稀释于碳酸盐缓冲液中（pH9.6），也可以采用 PBS（pH 7.2～7.4）或硼酸盐缓冲液（pH8.4）。

2）细胞应该尽可能快地铺板，准备细胞的时间应该预先设计好，尽量达到准备好的细胞马上就可以加入相应的孔中。无论是人外周血细胞还是小鼠的脾细胞，必须要破碎红细胞，以便尽量避免红细胞对结果的干扰。

3）细胞铺板后的最佳孵育时间应根据待测细胞因子及刺激物而定，因为不同细胞因子的分泌时间不同，刺激物不同也会带来同种细胞因子分泌的改变，如果孵育时间过短，则最终的斑点数会有所减少，而如果孵育时间过长，则背景会随之升高，都不利于得到准确的结果。

二、双色 ELISPOT 法

传统的 ELISPOT 法检测每个孔只检测一种细胞因子。如果要在一个 ELISPOT 孔内同时检测两种或者两种以上的细胞因子，则需包被两种相应的抗体以捕获两种细胞因

子，然后再用两种不同的酶标抗体以及显色剂显出两种斑点来。但是随之带来的就是斑点分离的问题。因为两种不同颜色以不同比例混合会表现出一系列不同的颜色，而其中的细微差异难以判断。因此，在双色 ELISPOT 方法中的斑点识别问题上，总会有些混色的斑点无法得到正确的识别与分类。为了解决这个难题，研究者想到了用荧光检测 ELISPOT 的方法。不同颜色的荧光混合在一起，只要运用不同的滤光片，就可以精确地滤出所需要的目标荧光，使荧光之间可以互不干扰。但是荧光 ELISPOT 检测目前还有许多的不足之处。例如，荧光素直接偶联在抗体或者亲和素上，缺乏酶催化底物的那种放大作用，所以灵敏度还无法和化学显色的 ELISPOT 方法比较，此外，硝酸纤维素膜在激发下就会自发产生荧光，所以不适合做荧光 ELISPOT 的底板材料，PVDF 膜也有自发荧光的问题，也会造成背景升高、信噪比下降的问题。目前，已经有一些公司在开发用于荧光 ELISPOT 的材料和试剂，但其使用还无法像单色 ELISPOT 法如此广泛和成熟。综上所述，双或多细胞因子检测是 ELISPOT 未来的一个发展方向，但在技术上还不够成熟，有待于进一步的发展和改进。

第五节　均相免疫酶标技术

一、酶免疫增强测定技术

酶免疫增强测定技术（enzyme-multiplied immunoassay technique，EMIT）是最早应用于实际的均相免疫酶标技术。主要用于检测小分子的抗原或半抗原，因此多应用于药物测定。酶免疫增强测定技术商品化的试剂盒的商标取名为 EMIT。

EMIT 的基本原理为：半抗原与酶结合形成酶标半抗原，同时保留半抗原和酶的活性。酶标半抗原与相应的抗体结合后，酶标半抗原中的半抗原与抗体密切接触，酶的活性中心受到影响，不能与底物结合导致酶活性被抑制（图 14-6）。EMIT 试剂盒中主要的试剂组成为：抗体、酶标半抗原、酶的底物。检测对象为标本中的半抗原或小分子抗原。当试剂盒中的酶标半抗原、抗体与待测标本混合后，待测标本中的半抗原或小分子抗原与酶标半抗原竞争性地与抗体相结合，如果标本中的半抗原含量较少，与抗体结合的酶标半抗原的比例增高，游离的具有酶活力的酶标半抗原的量就会相应的减少，根据反应后酶活力大小就可推算出标本中半抗原的量。

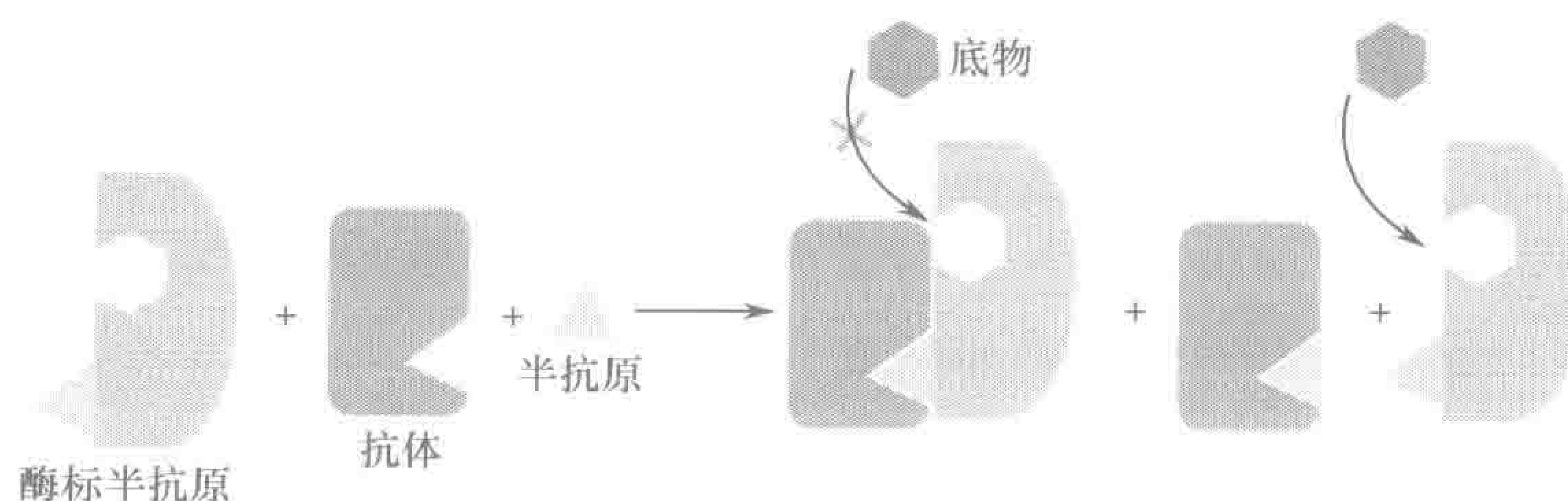


图 14-6　EMIT 反应原理示意图

二、克隆酶供体免疫测定

克隆酶供体免疫测定（cloned enzyme donor immunoassay，CEDIA）检测方法主要用于药物和小分子物质的测定，其反应模式为竞争抑制法。利用重组 DNA 技术制备β-半糖苷酶的两个片段，大片段称为酶受体（enzyme acceptor，EA），小片段称为酶供体（enzyme donor，ED），两个片段本身并不具有酶活性，但在适宜的条件下结合在一起就产生酶活性，利用两个片段的这个特性建立的均相免疫酶标技术称为克隆酶供体免疫测定。

CEDIA 反应的基本原理为：待测标本中的抗原和酶供体（ED）标记的抗原同一条件下与特异性抗体竞争结合，形成两种抗原-抗体复合物，即待测抗原-抗体复合物和 ED 标记抗原-抗体复合物。由于 ED 标记的抗原与抗体结合后产生空间位阻，不能再与酶受体（EA）结合而形成具有活性的酶。当反应平衡后，剩余的未与抗体结合的 ED 标记抗原与 EA 结合，形成具有活性的酶（图 14-7）。此时加入底物测定酶活力，从而推算出待测标本中的抗原含量，酶活力的大小与标本中抗原含量成正比。

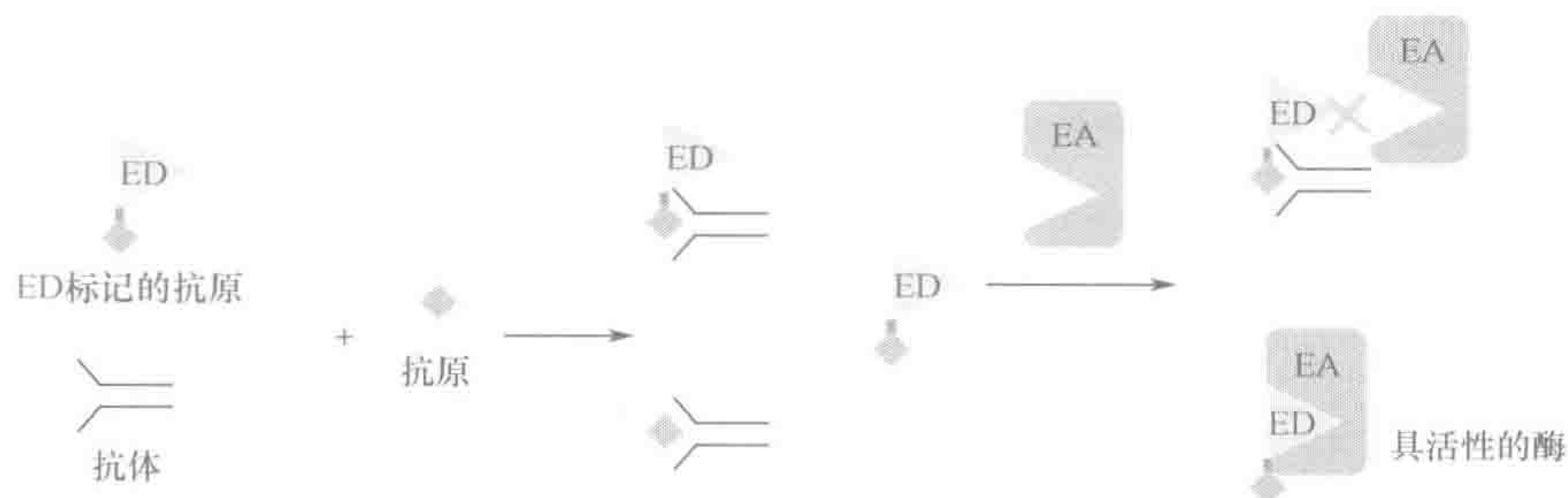


图 14-7　CEDIA 反应原理示意图

随着分子生物学、微纳电子学和分子组装技术等方面取得的进展，免疫酶标记技术正朝着一个全新的方向发展。实验体系中所采用的抗原、抗体及标记酶都在不断地得到发展，而且纳米技术也已应用于免疫酶检测中，在提高灵敏度、特异性、简化操作、缩短检测时间等方面取得了较好的效果。检测系统也已经和正在实现自动化、集成化和微型化，有助于实验操作的规范化和标准化，提高实验结果的准确性和重复性，并有助于实验室之间检测结果的互认。另外，免疫酶检测技术和免疫标记技术的其他方法之间的联合应用也越来越多地得以实现，从而更加扩大了免疫标记技术的检测和应用范围。

（吴艳峰）

参考文献

科利根 JE，比勒 BE，马古利斯 DH，等. 2009. 精编免疫学实验指南. 曹雪涛，于益芝，孙卫民，等译. 北京：科学出版社.

沈关心，周汝霖. 2002. 现代免疫学实验技术. 武汉：湖北科学技术出版社.

Kalyuzhny AE. 2005. Chemistry and biology of the ELISPOT assay. Methods Mol Med，302：15～31.

Plested JS, Coull PA, Gidney MA. 2003. ELISA. Methods Mol Med, 71: 243～261.

Ruedl C, Wick G, Wolf H. 1994. A novel and sensitive method for the detection of secreted cell products using time-resolved fluorescence. J Immunol Methods, 168: 61～67.

Sarawar SR, Doherty PC. 1994. Concurrent production of interleukin-2, interleukin-10, and gamma interferon in the regional lymph nodes of mice with influenza pneumonia. J Virol, 68: 3112～3119.

第十五章　发光免疫分析技术

发光免疫分析（luminescence immunoassay，LIA）是将发光分析技术（化学发光或者生物发光体系）和免疫反应相结合而建立的一种免疫分析技术，具有发光分析的高灵敏性和免疫反应的高特异性，能检测微量的抗原或抗体，是继酶免技术（enzyme immunoassay，EIA）、放免技术（radioimmunoassay，RIA）、荧光免疫技术（fluorescence immunoassay，FIA）之后发展的一项新兴测定技术。自20世纪70年代Schroder和Halman首次应用化学发光免疫技术检测甲状腺素以来，发光免疫分析技术快速发展，已出现多学科、多技术联合应用的发光免疫分析技术。目前根据所采用的发光标记物不同，发光免疫分析技术的发展历程大致可以分为4阶段。

第一阶段：主要以鲁米诺（Luminol）及其衍生物（如异鲁米诺等）作为发光标记物。由于受当时技术条件限制，再加上当时所采用的发光体系的发光信号弱，持续时间短，所以没有得到广泛应用。

第二阶段：建立了以酶，如辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记为主的发光免疫分析技术，又称为增强发光酶免疫分析。酶的加入主要是催化底物发光，可以提高发光信号的强度和延长发光时间。

第三阶段：以大量新的化学标记物运用为主，如吖啶盐类化合物等可以直接标记的发光物。此类化学标记物稳定，发光信号强，是目前化学发光免疫分析中最主要的标记物。

第四阶段：电化学发光免疫分析技术的出现。电化学发光原理实际上与上述不同，主要是利用电化学手段而产生化学发光。此技术具有很高的灵敏度和较弱的本底信号，特异性高，操作也方便。

近十几年来，由于新技术、新材料的不断发展和涌现，原有的发光免疫分析技术得到进一步的提高和完善，而且也出现了一些与传统发光免疫分析技术不同的新型发光免疫分析技术，如微粒体免疫分析技术（microparticle luminescence enzyme immunoassay，MLEIA）、时间分辨免疫分析技术（time resolved fluoluminescence immunoassay，TRFIA）和激光免疫分析技术（laser immunoassay，LIA）等。

目前根据发光免疫分析中发光反应、标记物及标记方法的不同，大体上可以将其分为3种类型：化学发光免疫分析技术（chemiluminescence immunoassay，CLIA）、化学发光酶免疫分析技术（chemiluminescence enzyme immunoassay，CLEIA）、生物发光免疫分析技术（bioluminescence immunoassay，BLIA）；而在反应体系中所采用的能产生示踪信号的发光体系主要有化学发光体系和生物发光体系。

第一节　化学发光和生物发光

一、化学发光

（一）化学发光的原理

化学发光（chemiluminescence）是指在化学反应过程中所产生光的发射现象。某些物质（如发光剂）在化学反应时，吸收了反应过程中所产生的化学能，使反应的产物分子或反应的中间态分子中的电子跃迁到激发态，当电子从激发态回复到基态时能以发射光子的形式释放出能量，这一现象称为化学发光。

（二）化学发光产生的条件和过程

化学发光与其他发光体系的本质区别是反应体系产生发光（光辐射）所吸收的能量来源不同，即激发能不同。反应体系要产生化学发光，应当具备以下条件：① 具有一个能产生可检信号的光辐射反应，即必须提供足够的能量；② 一个可一次性提供能导致发光现象所需足够能量的单独化学反应，也就是说吸收了化学能而处于激发态的分子和原子，必须能释放出光子或者能将能量转移到另一个物质的分子上并使这种分子激发，当这种分子回到基态时就释放出光子。由于很多化学反应中能量是以热或其他的形式释放而并不能产生光，因此能应用到化学发光免疫分析技术中的化学反应不多。

（三）化学发光剂

在化学发光反应中参与能量转移并最终以发射光子的形式释放能量的化合物，称为化学发光剂或发光底物。一般来说能作为化学发光剂必须具备以下条件：① 具有较高的光量子产率；② 与被标记或待测定物质的物理和化学特性相匹配；③ 能与抗原或抗体形成稳定的偶联结合物；④ 其化学发光常是氧化反应的结果；⑤ 在所使用的浓度范围内对生物体没有毒性。

常用的几种化学发光剂如下。

1. 吖啶盐类化合物

吖啶盐类化合物在碱性溶液中氧化时可以产生化学发光行为，其中 *N*-*N*-二甲基吖啶硝酸盐［俗称光泽精（lucigenin）］是最常见的化学发光剂。吖啶酯类在碱性条件下被双氧水（H_2O_2）氧化时，能发出波长为 470nm 的光，具有很高的发光效率，其激发态产物 *N*-甲基吖啶酮是该发光反应体系的发光体，如图 15-1 所示。吖啶酯类化合物是一类很有前景的非放射性核酸探针标记物（如用作 DNA 的发光探针），其发光量子产率高，稳定性好；同时标记物对杂交反应的动力学和杂交体的稳定性几乎不产生影响，可以直接在碱性介质中进行化学发光反应。

2. 酰肼类

酰肼类包括鲁米诺及其衍生物异鲁米诺等。鲁米诺在碱性条件下可被一些氧化剂氧

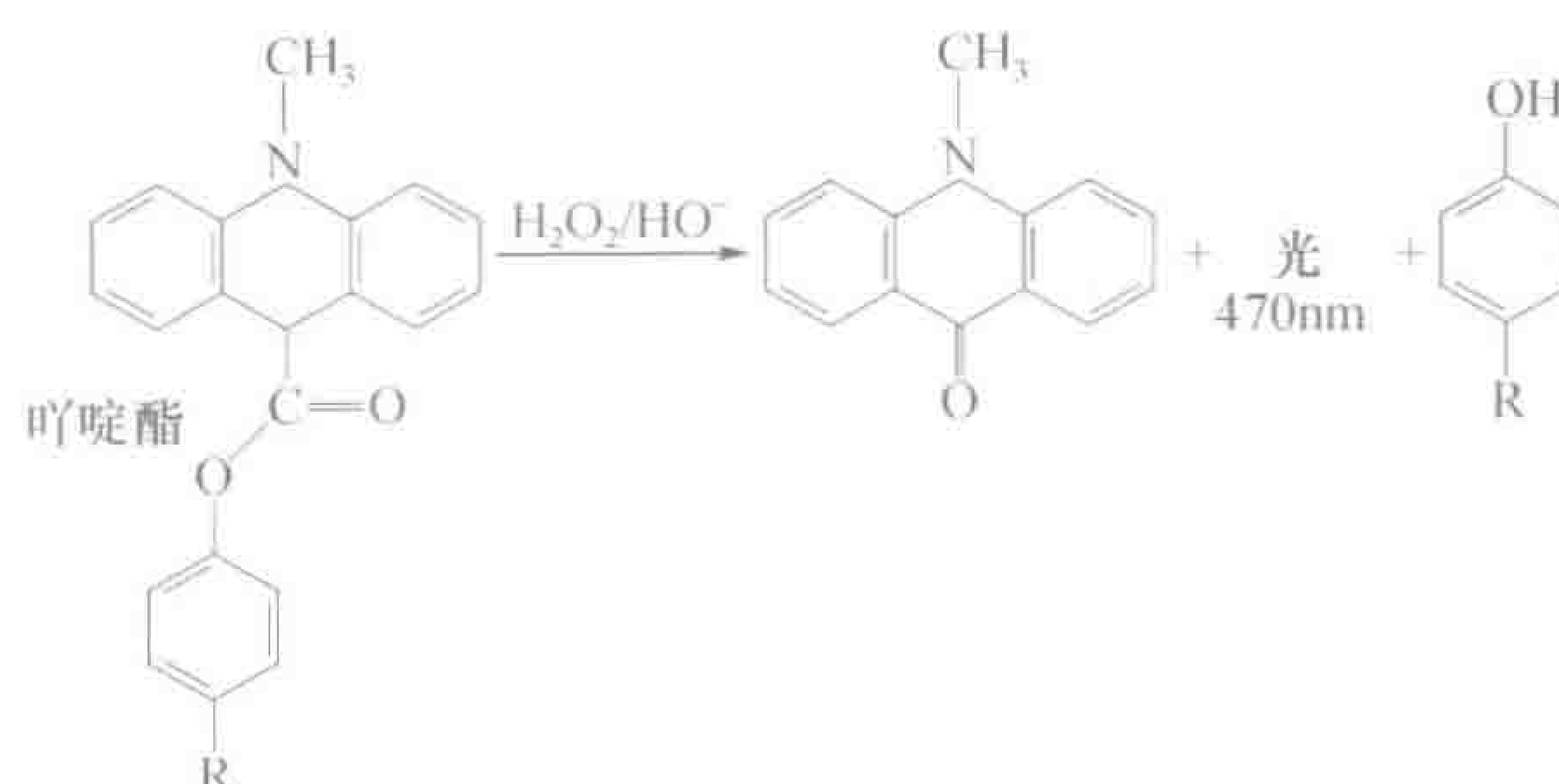


图 15-1　吖啶酯发光示意图

化而发生化学发光反应，在此反应过程中可以辐射出最大发射波长为 425nm 的化学发光，如图 15-2 所示。由于此类发光反应的反应速度很慢，目前常在反应体系中加入某些催化剂（如金属离子），使发光反应速率大大提高。同时由于金属离子浓度与发光强度在很大浓度范围内成正比，所以可以进行某些金属离子的化学发光分析，并利用这一方法分析那些含有金属离子的有机化合物，另外也可以用酶来催化（如 HRP）或使用反应增强稳定剂（主要是含有苯酚环的试剂，如对-碘酚或对-苯酚等）。

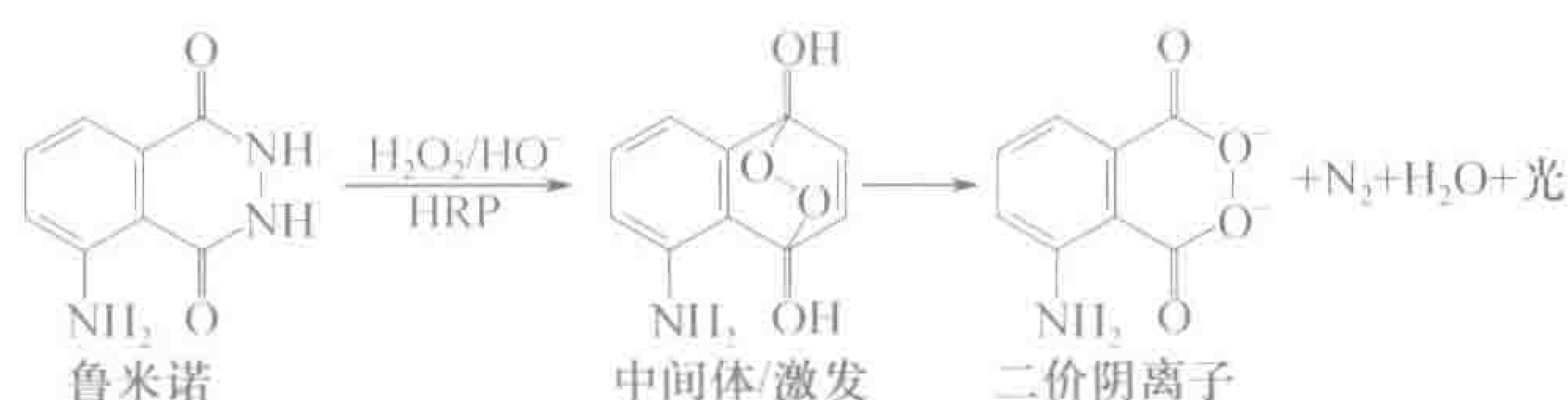


图 15-2　鲁米诺发光示意图

3. 咪唑类化合物

常用的是 2，4，5-三苯基，俗称洛酚碱（lophine）。洛酚在碱性介质中被过氧化氢等氧化剂氧化后先生成过氧化物，然后过氧化物重排生成一种双氧基化合物，此双氧基化合物可以分解发光，最大波长为 530nm。洛酚碱目前主要用于各种元素的分析测定。

4. 草酸盐类

草酸盐类化合物本身不是有效的化学发光剂，但可以和 H_2O_2 反应生成过氧化物［以过氧草酰（peroxalate）最为常见］中间体，因此这类反应又称过氧草酰类化学发光反应。目前此类化合物应用有限，其广泛的应用还有待于新的荧光衍生试剂的开发，或与其他发光体系联合使用。

5. AMPPD

AMPPD［3-(2′-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷酰氧基)苯-1,2-二氧杂环丁烷］实际上是一种非常灵敏的碱性磷酸酶底物（alkaline phosphatase，ALP）。一般情况下 AMPPD 非常稳定，但在碱性磷酸酶的作用下能迅速脱去磷酸根基团，形成一个不稳定

的中间体；然后此中间体自行分解并伴随光子发射，同时形成波长为 470nm 的持续光（可持续 1h 左右）。AMPPD 方法目前已广泛应用于临床免疫检测（如自身免疫性抗体、激素及肿瘤标志物等检测）。AMPPD 发光原理如图 15-3 所示。

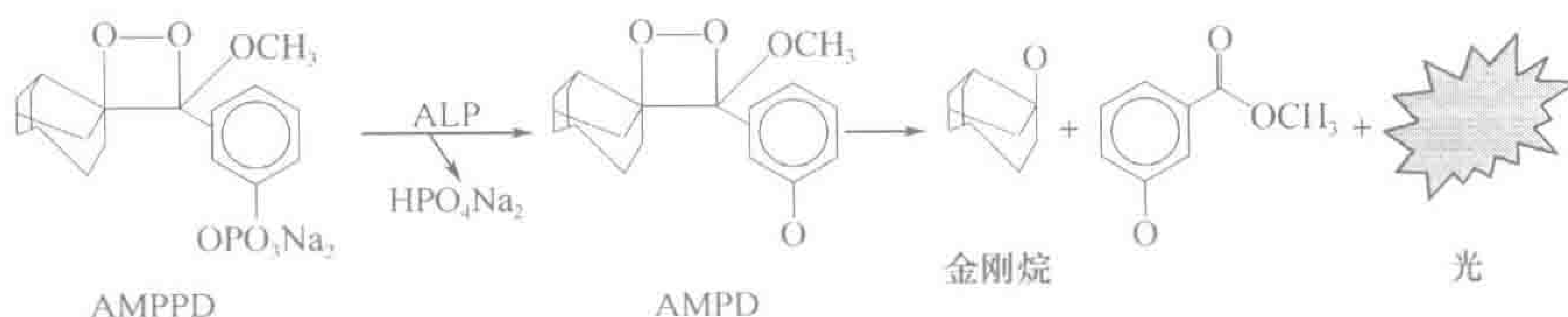


图 15-3　AMPPD 发光原理

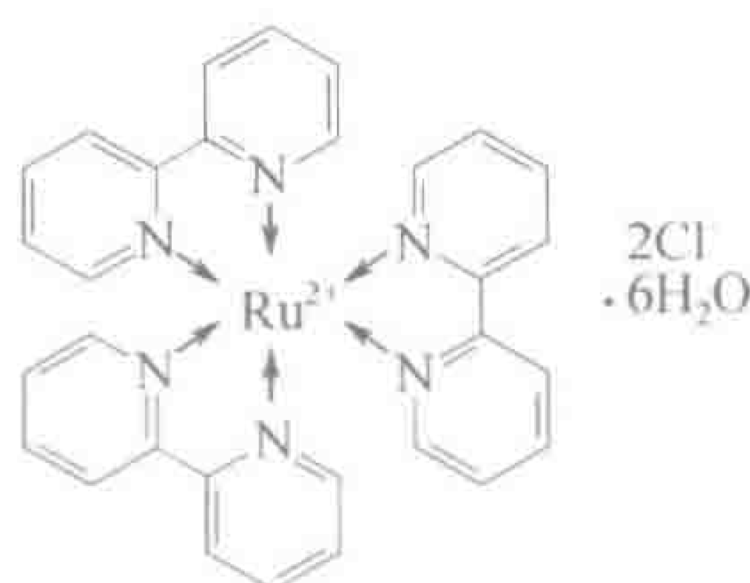


图 15-4　三联吡啶钌结构

6. 三联吡啶钌

三联吡啶钌 $[RU(bpy)_3]^{2+}$ 是电化学发光剂，它和电子供体三丙胺（TPA）在阳电极表面可同时失去一个电子而发生氧化反应，如图 15-4 所示。三联吡啶钌具有良好的受激发特性，在电化学发光分析体系和高效液相色谱分析体系中已得到广泛应用。同时由于其分子质量小，空间阻位也很小，也可用于标记小分子核酸。

（四）化学发光效率

化学发光效率决定于生成激发态产物分子的化学激发效率（φCE）和激发态分子的发射效率（φEM）。化学发光反应的发光效率、光辐射的能量大小以及光谱范围完全由发光物质的性质所决定，每一个发光反应都具有其特征性的化学发光光谱和不同的化学发光效率。它的定义为：φCL＝ 发射光子的分子数/参加反应的分子数＝φCE×φEM。

二、生物发光

（一）原理

广义的生物发光可以泛指自然界一切生物体发光的现象。生物体不停地与外界进行物质和能量的交换，而光的吸收和发射是一种很重要的能量交换方式，因此生物发光是很普遍的现象，但不同的生物体其发光机理、强度和光谱范围都有很大差异。现国际上统一按发生机理分为 4 种：受激荧光、发光生物发光、化学发光和生物的超微弱发光。本章所讲述的生物发光实际是指发光生物发光。

发光生物发光是生物体内的发光现象，最常见的如萤火虫、发光水母等，实际上其发光本质是发生在生物体内的酶促化学发光。大多数生物体发光所采用的模式是在生物体内酶的催化下，氧化一个荧光素就会产生一个光子，从而发出光。在一些腔肠动物体内，荧光素则换成了光蛋白，如常见的发光水母的绿色荧光蛋白，这些绿色荧光蛋白与钙或者铁离子结合发生反应从而发光。

（二）生物发光产生的条件和过程

一般来说实现生物发光需两个必备条件：荧光素酶（luciferase）和荧光素酶作用的底物，在一个能发光的生物个体中至少存在能编码这两种物质的序列。目前已发现多种荧光素酶及其对应适应的底物。在一个生物发光体系中，有时需要多种酶底物，而有时可能需要多种酶；另外氧也是生物发光不可缺少的一个因素。

（三）生物发光体系种类

目前生物发光体系主要有以下几种类型。

1. 荧光素（luciferin）-荧光素酶发光体系

荧光素和荧光素酶在ATP、金属离子 Mg^{2+} 和 O_2 存在的条件下发光。基本过程为：① 荧光素酶和ATP分子结合；② 荧光素结合到荧光素酶上并在ATP分子作用下释放焦磷酸根离子，同时单磷酸腺苷（AMP）则与荧光素的羧基相连接；③ 荧光素-AMP络合物被氧化生成过氧氢化物，后者与羟基生成环状内式过氧化物并释出AMP。环内式的过氧化物很不稳定，易脱羧生成一种处于电子激发态的酮式荧光素，并发射一个光子（荧光）。

目前荧光素-荧光素酶发光体系已经得到广泛应用，如在体外可以重组荧光素酶，然后再利用基因工程技术在生物体内（如大肠杆菌）表达；或者利用分子克隆技术直接将编码荧光素酶的基因克隆到不同生物体内，如目前已广泛用于基础科学研究中的各种荧光素酶报道基因；也可以建立各种带有荧光基因的质粒载体，如带有绿色荧光蛋白（GFP）的质粒。目前常用的有 pcDNA3.1/NRed（一）C、pIRES2-EGFP、VNG-IRES等。

2. 发光细菌的发光体系

随着对发光细菌的分类、生态和发光机理的深入研究，目前对细菌发光的生化反应有较为科学的模型，并逐步明确了细菌发光的原理。细菌发光是由细菌荧光素酶催化，黄素单核苷酸、氧以及直链脂肪酸共同参与的一个复杂过程。一般而言，在细菌生长的对数中期会出现发光的高峰。目前细菌的发光基因已经被克隆，同荧光素酶基因一样也可以通过基因工程技术表达于其他生物体（如大肠杆菌）。另外如作为报道基因的发光细菌Lux基因系统已经在基础科研（如分子生物学、免疫学等）、临床检验等方面得到广泛应用。

第二节 发光标记物及其标记方法

一、发光标记物的选择

目前在发光体系中所使用的标记物大体可以分为两种：直接参与发光反应的标记物和非直接参与发光反应而起催化作用的标记物。

1. 直接参与发光反应的标记物

这类标记物具有特有的可以产生发光的化学基团，在发光反应过程中能直接发光。这类物质一般没有本底发光，因此可以精确测定。常用的标记物有以下几类。

1）鲁米诺及其衍生物：鲁米诺是最早合成的发光物质，发光效率低下，现多用其衍生物，如异鲁米诺等或加入酶及其他增强稳定剂。

2）吖啶盐类化合物：吖啶盐类化合物稳定性好，具有较高的发光效率，标记物对杂交反应的动力学和杂交体的稳定性几乎不产生影响，并且其化学发光分析时间很短。吖啶盐类化合物是目前最常用的化学发光免疫分析技术中直接参与发光反应的标记物。

2. 间接参与发光的标记物

此类标记物可以作为发光反应体系的催化剂或者作为一种能量传递过程中的受体，不直接参与发光反应，主要是一些酶标记物和非酶标记物。

1）酶标记物：常用的酶有辣根过氧化物酶（HRP）、碱性磷酸酶（ALP）、荧光素酶。其他的有葡萄糖氧化酶（glucose oxidase，GOD）、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和丙酮酸激酶等。

2）非酶标记物：常用的有三联吡啶钌标记物，主要用于电化学免疫分析。

二、发光标记物常用的标记方法及影响因素

目前常用的标记方法主要有生物标记法和化学标记法。

（一）生物标记法

将发光物质加在动植物或微生物生长环境中，让生物吸收利用，从而引入发光物质而制备发光标记物。

（二）化学标记法

通过化学方法将一种分子共价偶联到另一种分子上，参与偶联的物质分别称为标记物和被标记物。标记物可以是能直接发光的物质，也可以是催化发光反应的物质。标记物和被标记物可以直接偶联，也可以间接偶联。常用的化学标记方法有碳二亚胺（EDC）缩合法、过碘酸钠（sodium periodate）氧化法、重氮盐偶联法、*N*-羟基琥珀酰亚胺活化法，其他的还有混合酸酐法、环内酸酐法等。

1. EDC 缩合法

常用于制备大分子之间或大分子-半抗原衍生物的偶联结合物。经过碳二亚胺缩合，蛋白质分子中的游离羧基和发光物质中的氨基形成稳定的酰胺键。反应过程温和，应用范围广泛。反应过程如图 15-5 所示。

2. 过碘酸钠氧化法

过碘酸钠（sudium periodate）具有强氧化作用，能将酶偶联到抗体上，因此常用于酶标记（一般来说仅适于含糖较丰富的酶，如 HRP）。过碘酸钠可以使 HRP 糖分子内的—CH 基氧化成—CHO基，然后再与抗体蛋白的游离氨基反应，生成 Shiff 碱。此

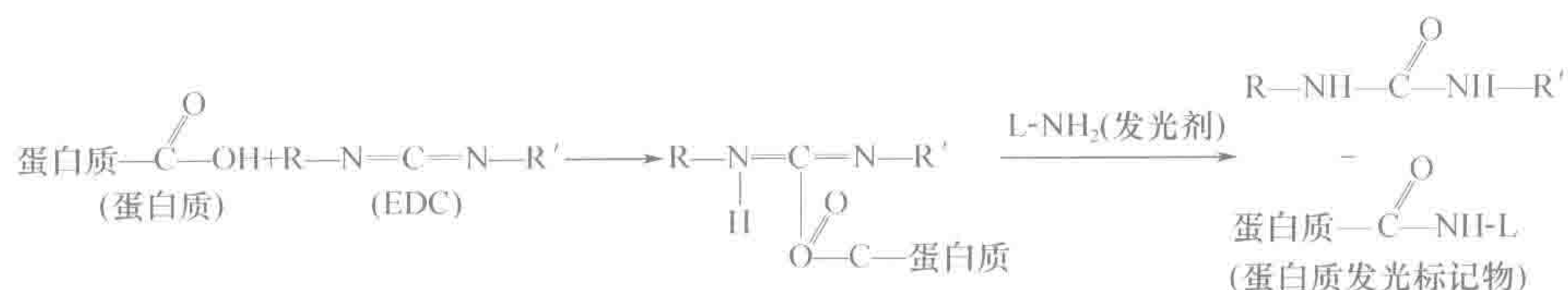


图 15-5　EDC 缩合法

Shiff 碱在 pH 降低时能可逆性解离，再经氢硼化钠（NaBH4）还原后形成稳定的酶标抗体复合物，反应过程如图 15-6 所示。通常为防止生成的—CHO 基与酶蛋白氨基自身交联，常用二硝基氟苯（dintro-fluorobenzene）预处理 HRP，以阻断分子内的 ε-氨基、α-氨基。

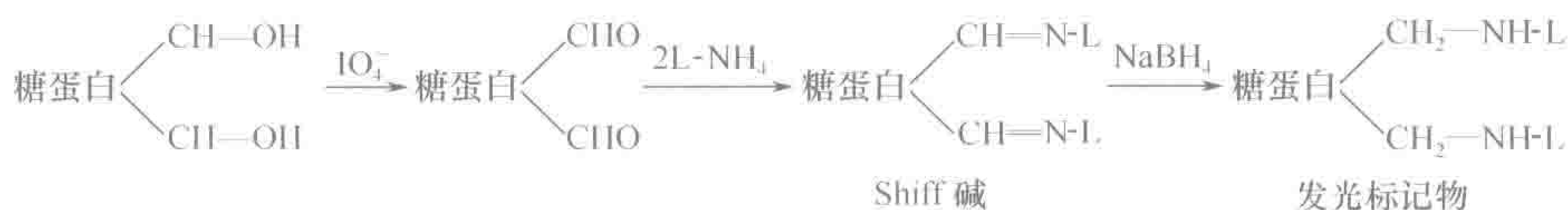


图 15-6　过碘酸钠氧化法

3. 重氮盐偶联法

重氮盐能直接耦合蛋白质分子酪氨酸残基上的酚羟基邻位、组氨酸残基的咪唑环以及色氨酸残基的吲哚环，形成偶氮化合物。此类标记方法简便有效，成本低，同时又有较好的重复性，因此得以广泛采用，但对于没有芳香伯氨基或氨基位于侧链的发光剂（如异鲁米诺）则不宜采用此标记方法。标记反应示意图如 15-7。



图 15-7　重氮盐偶联法

4. *N*-羟基琥珀酰亚胺活化法

经 *N*-羟基琥珀酰亚胺活化的蛋白质分子羧基可以和发光剂的氨基偶联生成酰胺键从而形成标记物，反应过程见图 15-8。

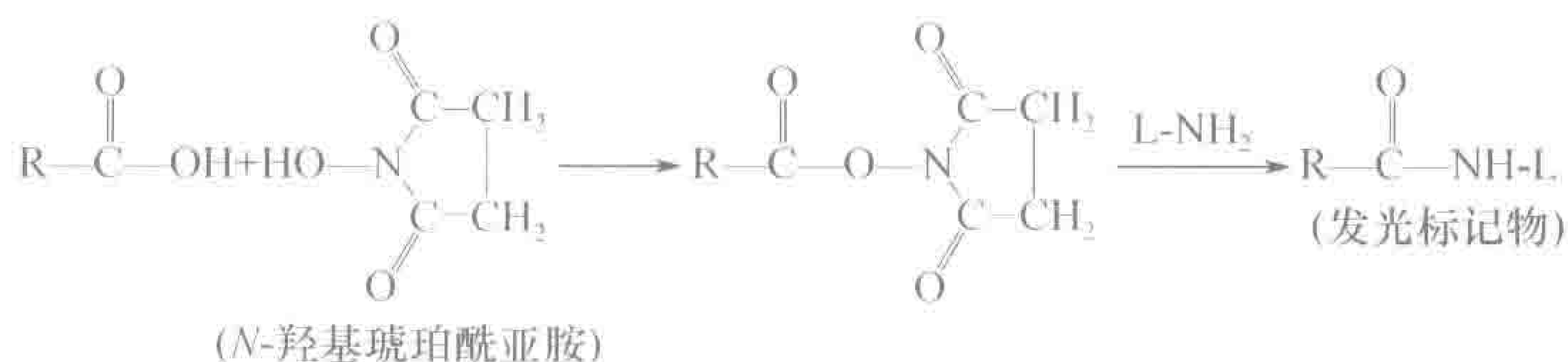


图 15-8　*N*-羟基琥珀酰亚胺活化法

（三）影响标记的因素

1）发光剂的选择：选择合适的标记方法来标记发光剂是获得理想标记的重要条件。如选用氨基苯二酰肼类发光剂作为标记物时应优先选用鲁米诺及其衍生物。

2）被标记蛋白质的性质：被标记的抗原应具有高纯度性和免疫学稳定性。

3）标记方法的选择：不同的标记方法有各自不同的优缺点，有各自适合的反应条件和适应对象，应根据发光剂和被标记物的结构特点来选择合适的标记方法。例如，吖啶酯类发光剂多选用 *N*-羟基琥珀酰亚胺法。

4）原料比、标记率和温度：被标记物、标记物和交联剂之间的比例也会影响结合物的发光效率，因此必须选择它们之间合适的摩尔比。标记率（是指结合物中 IgG 与发光剂之间的摩尔比，每种发光剂和被标记物之间都有最佳的标记率）选择不当，会影响发光率，并且不易保存。温度对于稳定的小分子被标记物可适当放宽，对于不稳定的蛋白质，如抗原或抗体，应当尽量选择低温标记。同时也要考虑所选择的溶剂对蛋白质的凝聚或者变性作用。

5）纯化与保存：纯化是为了除去反应体系中存在的未结合的发光剂和交联剂。一般可以采用透析法、凝胶过滤和盐析沉淀法。纯化后应尽快测定蛋白质的含量、免疫学活性及发光率等指标。纯化后的结合物一般保存于－70～4℃，最好冰冻干燥保存，长时间保存后再使用时应测定以上指标。

第三节　发光免疫分析技术分类及发展前景

一、发光免疫分析技术分类

目前根据发光免疫分析中产生发光反应的不同体系，发光免疫分析技术大体可以分为两类：化学发光免疫分析技术和生物发光免疫分析技术。

（一）化学发光免疫分析

以化学物质标记抗原或抗体，免疫反应后直接引起化学反应进行检测。化学发光免疫分析实际上包含两部分，即化学发光分析系统和免疫反应系统。化学发光分析系统是利用化学发光物质经催化剂的催化和氧化剂的氧化，形成一个激发态的中间体，当这种激发态中间体回到稳定的基态时，同时发射出光子，利用发光信号测量仪器测量光量子产额。免疫反应系统是标记了发光物质或酶的抗原（antigen，Ag）或抗体（antibody，Ab）与相应的抗体或抗原的免疫反应。

在化学反应的基础上，根据标记物的不同又可将其分为化学发光免疫分析法、化学发光酶免疫分析法、电化学免疫分析技术。

1. 化学发光免疫分析法（CLIA）

CLIA 用化学发光剂（目前最常用的是吖啶酯类化合物）直接标记 Ag 或 Ab，与待测标本中相应 Ab 或 Ag 反应，然后将结合状态（沉淀部分）和游离状态的化学发光标

记物分离，再加入发光促进剂（如 NaOH 和 H_2O_2）进行发光反应，通过对发光强度的检测进行定量或定性检测。由于标记物在化学反应过程中可直接发光，且光信号强，可持续较长时间，因此整个检测过程简单、快速、无需催化剂。

2. 化学发光酶免疫分析法（CLEIA）

CLEIA 是用参与催化某一化学发光反应的酶来标记 Ag 或 Ab，再与待测标本中相应的 Ab 或 Ag 发生免疫反应后，形成固相包被抗体-待测抗原-酶标记抗体复合物，洗涤后，加入底物（发光剂），经酶催化和底物分解发光，然后由光检系统收集，并将光信号转变为电信号后加以放大，最后由计算机数据处理系统计算出测定物的浓度。常用的酶标记化学免疫分析方法有以下几种。

HRP 标记的 CLEIA

常用的底物为鲁米诺及其衍生物异鲁米诺、对羟基-苯乙酸等。此分析体系中用辣根过氧化物酶（HRP）标记抗体（或抗原）和待检标本及预先包被在固相载体上的抗体或抗原发生免疫反应后，可形成固相包被抗体-待测抗原-酶（HRP）或者是抗原-待测抗体-酶（HRP）标记抗体复合物（双抗体夹心法），经洗涤后，加入鲁米诺发光剂、H_2O_2 和化学发光增强剂使之产生化学发光。鲁米诺的氧化反应在碱性缓冲液中进行，其波长为 425nm。反应示意图如图 15-9 所示。

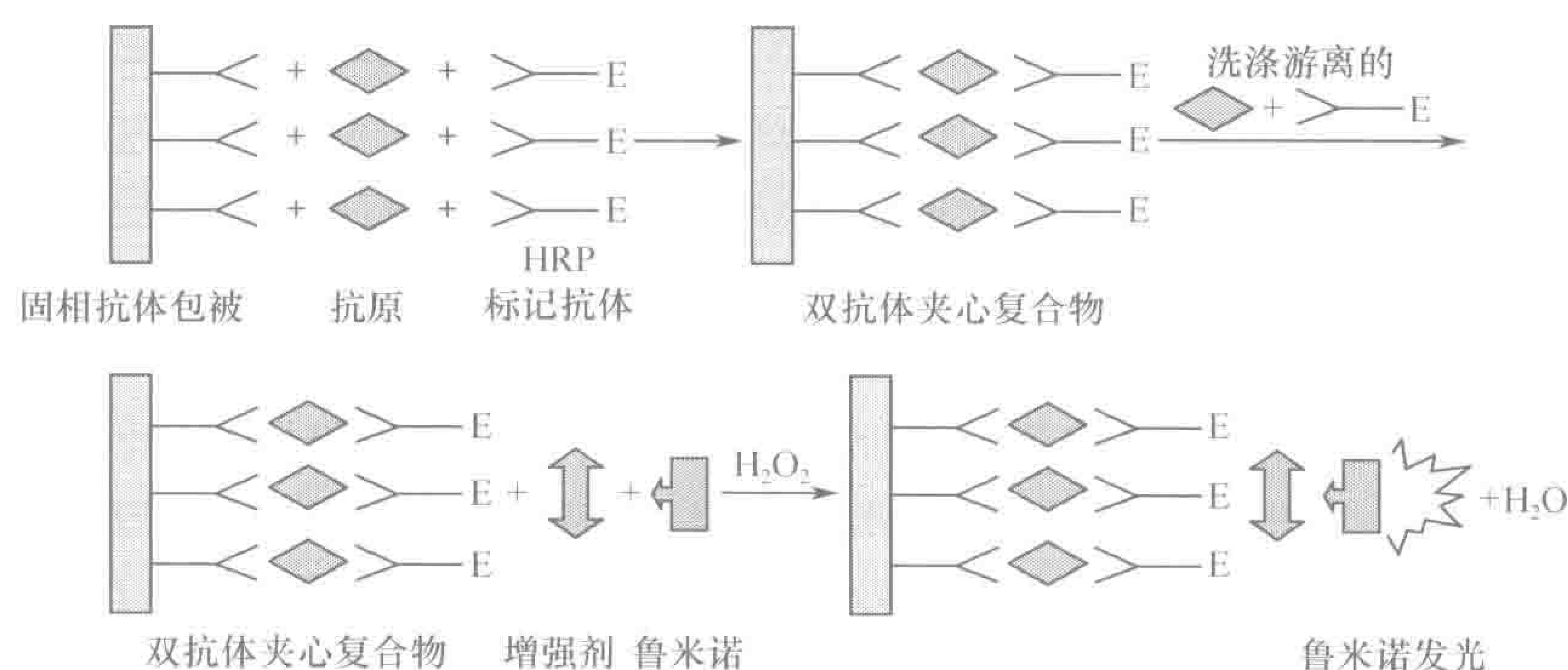


图 15-9　HRP 标记的 CLEIA

ALP 标记的 CLEIA

该分析系统以碱性磷酸酶（ALP）标记抗体（或抗原），与反应体系中的待测标本和固相载体发生免疫反应后，形成固相包被抗体-待测抗原-酶（ALP）标记抗体复合物，洗涤后加入底物 AMPPD，在碱性磷酸酶（ALP）作用下，AMPPD 磷酸酯基发生水解而脱去一个磷酸基，得到一个中等稳定的中间体 AMPD（半衰期为 2～30min），此中间体经分子内电子转移裂解为一分子的金刚烷酮和一分子处于激发态的间氧苯甲酸甲酯阴离子，当其回到基态时产生 470nm 的光，并可稳定持续 15～60min。AMPPD 为磷酸酯酶的直接化学发光底物，可用来检测碱性磷酸酯酶或酶和抗体、核酸探针及其他配基的结合物。反应示意图如图 15-10 所示。

增强发光酶免疫分析

增强发光酶免疫分析实际上是在前述酶标记的基础上加入一系列的辅助剂（如各种

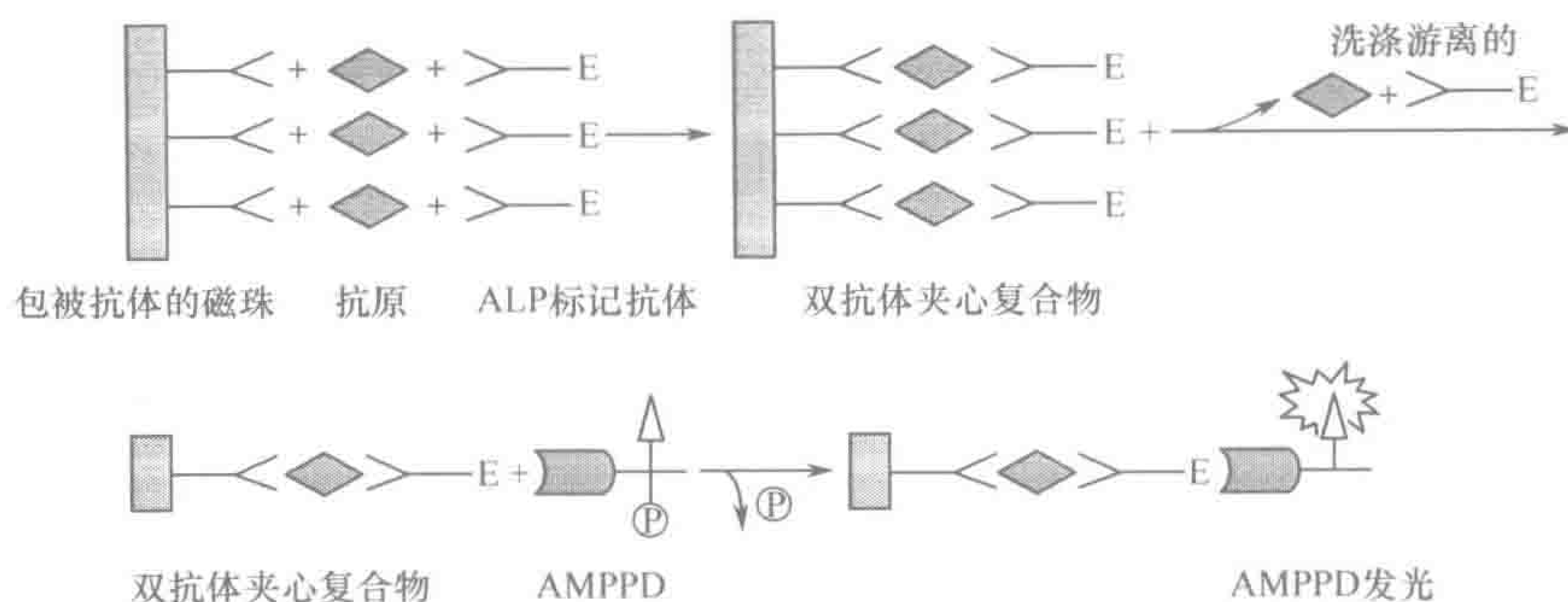


图 15-10　ALP 标记的 CLEIA

稳定剂、增强剂等)，这样可以提高灵敏度，延长发光时间，并可以配制成一种能够长期稳定保存的发光增强液。例如，在 HRP 标记的 CLEIA 反应体系中，加入增强稳定剂（如对-碘酚或对-苯酚等)，可以增强发光信号，延长发光时间，易于重复测量，从而提高分析灵敏度和准确性。目前的化学发光酶免疫分析几乎都要使用到发光增强剂，以提高分析的效率。

3. 电化学免疫分析技术（ECLIA）

电化学免疫分析技术可以说是多学科、对技术结合运用的结果。主要是以电化学发光剂三联吡啶钌标记 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 抗体（抗原)，以三丙胺（TPA）为电子供体，在电场中因电子转移而发生在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应，根据三联吡啶钌在电极上发出的光强度可以对待测的抗原或抗体进行定量，整个过程包括电化学和化学发光两个过程。

其大概步骤是先固相包被抗体或抗原（常用的固相载体为磁性微粒)，用三联吡啶钌标记第二抗体，在反应体系内待测标本中抗原可以和固相包被的抗体以及三联吡啶钌标记的抗体发生免疫反应，形成磁性微粒包被抗体-待测抗原-三联吡啶钌标记抗体复合物（双抗体夹心法)，这时将上述复合物吸入流动室，同时引入 TPA 缓冲液。当磁性微粒流经电极表面时就能够被安装在电极下面的电磁铁吸引住，而未结合的标记抗体和标本被缓冲液冲走。与此同时电极加压，启动电化学发光反应，使三联吡啶钌和 TPA 在电极表面进行电子转移，产生电化学发光，光的强度与待测抗原的浓度成正比。反应示意图如图 15-11 所示。

（二）生物发光免疫分析

利用生物发光物质或参与生物发光反应的辅助因子（如 ATP、NAD 等）可对活细胞进行各种生物学功能检测，如用荧光素酶报道基因可以检测细胞增殖或凋亡现象等；在肿瘤细胞的放化疗过程中也可以检测临床治疗疗效。在免疫学中，可以将编码荧光素酶的基因或发光蛋白基因与第二个基因（编码结合蛋白，如蛋白 A、蛋白 G、链霉亲和素或生物素受体肽）形成融合基因，也可以体外重组融合蛋白，此技术已广泛用于免疫分析，如蛋白质印迹等。生物发光反应也是检测酶标记的非常灵敏的方法，目前有多种

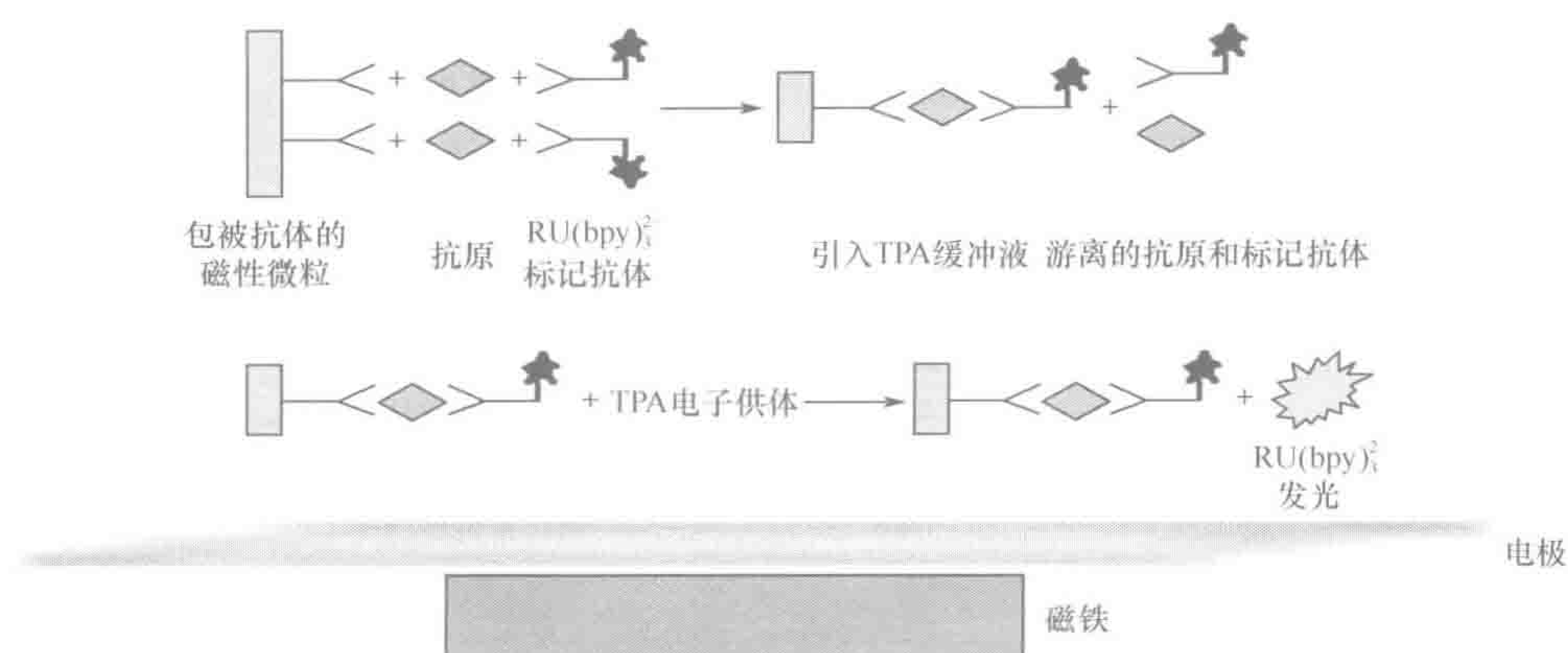


图 15-11　电化学免疫反应示意图

双功能生物发光分子已经被应用到各种免疫检测方法中。

二、目前发光免疫分析方法的商品化产品常用发光原理及免疫反应原理

目前发光免疫分析方法几乎都是全自动免疫分析仪，尤其是临床免疫检验，并且都是配套的试剂盒，也有少数为半自动方式（少数以微孔板作为固相载体的测定方式，如各种微孔板酶标仪）。虽然发光免疫分析方法发展很快，方法种类也很多，但其基本检测原理大致相同，实际检测步骤也大同小异，一般有一步法和二步法。

1）一步法：共孵育固相包被的抗体或抗原、待检标本和标记的抗体或抗原→反应30～60min→洗涤，以除去未结合的反应物→加入发光底物→反应 5～30min→仪器检测。

2）二步法：共孵育固相包被的抗体或抗原和待检标本→反应 30～60min→洗涤，以除去未结合的反应物→加入标记的抗体或抗原反应→30～60min→洗涤，以除去未结合的反应物→加入发光底物→反应 5～30min→仪器检测。

常用的免疫反应原理如下。

1）双抗体夹心法：先固相包被抗体，然后加入待检标本，共孵育后洗涤，再加入标记抗体（二抗），共孵育后再洗涤，加入发光底物反应，仪器检测。

2）竞争法：固相包被抗体后加入标记抗原，洗涤后加入待检标本（有的仪器或试剂盒采用同时加入标记抗原和待检标本），共孵育后洗涤，加入发光底物反应，仪器检测。

3）俘获法：固相包被抗体（俘获抗体或二抗，结合位点与标记抗原结合的位点不同），加入待检标本，共孵育后洗涤，再加入标记抗原，共孵育并洗涤，加入发光底物反应，仪器检测。

4）双抗原夹心法：固相包被抗原，加入待检标本共孵育，洗涤后加入标记抗原孵育，洗涤后加入发光底物反应，仪器检测。

5）间接包被夹心法：包被连接物（此连接物结合着能结合待检标本中抗原的俘获抗体），加入待检标本共孵育，洗涤后加入标记抗体孵育，再洗涤后加入发光底

物反应，仪器检测。

目前临床上常见的几种发光免疫分析仪器及其发光原理见表 15-1。

表 15-1　临床常见的几种发光仪及其发光原理

分类	公司	产品	反应原理
直接化学发光	Bayer	ACS-180SE	吖啶酯(pH)
酶促化学发光	DPC	Immulite	碱性磷酸酶/AMPPD[a]
	Beckman-coulter	ACCESS	碱性磷酸酶/Lumi-Phos* 530[b]
		ACCESS2	碱性磷酸酶/AMPPD
	ABBOTT	IMX	碱性磷酸酶/4-MUP[c]
	OCD-Johnson	ECi	HRP/鲁米诺+增强剂
电化学发光	Roche	ECL2010	三联吡啶钌/TPA[d]

a. 3-(2′-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3″-磷酰氧基)苯-1,2-二氧杂环丁烷；b. 1,2-二氧环已烷衍生物；c. 4-甲基伞型铜磷酸盐；d. 三丙胺。

综合分析目前的商品化发光免疫分析产品，可以得出以下特点：自动化程度高目前也有一些半自动化仪器（如 ELISA 测定的酶标仪）；多采用磁性或非磁性微粒包被（增加接触表面积、提高灵敏度）；多数自动分析仪中有内建标准曲线和校正方法（多数配备有校正液）；检测项目广泛（如激素类、肿瘤标记物、病毒标记物、自身免疫抗体、过敏性疾病、感染性疾病、药物治疗检测等）；所采用的免疫反应原理基本一致。

第四节　展　　望

总之，发光免疫分析作为一种非放射性免疫分析技术，具有灵敏度高、特异性强、标记物稳定、线性范围宽等特点；同时自动化程度高并且检测程序简便、所需检测标本量少、分析速度快。经过三十多年的发展，目前已成为融合多学科知识、多种新技术的一种检测方法，并广泛应用于临床检验、环境检测、食品安全和工业分析等领域。进入 21 世纪后，随着基因工程技术的长足发展（如基因工程抗体以及模拟抗体、基因工程酶、转基因技术等），新型标记物、酶底物（如人工合成的对位化合物、HRP 的阴离子型同工酶）和新固相材料（微粒体技术、磁颗粒、纳米等技术）的发现，新标记技术（磁颗粒及纳米技术等）及联用检测技术（如分离技术与 CLIA 的联用、毛细管电泳和 CLIA 的联用等）的运用，以及免疫测定的自动化、集成化和微型化，发光免疫分析技术在试剂、检测方法和仪器等方面已呈现出新的发展趋势，如检测仪器由以前的全封闭式转向开放式，试剂盒也由专配的变成多规格、多公司提供。目前，我国在全自动发光免疫分析仪器的制造以及试剂盒的生产上和国外有一定的差距，但随着我国在高新精密制造技术方面的发展，相关领域的基础理论研究的进步等，国产发光免疫分析仪，尤其是高质量的试剂盒已取得初步的成果。

（杨明金）

参考文献

陈曦. 1998. 联吡啶钌（Ⅱ）电致化学发光原理及其在流动注射分析和高效液相色谱法中的应用. 色谱，16（4）：53～55.

李勤. 2004. 生物系统的发光原理及其应用. 生命科学仪器，2（4）：33～37.

李振甲，应希堂，马世俊. 2006. 化学发光免疫分析技术的研究现状与展望. 国际检验医学杂志：27（1）：95～96.

沈关心，周汝麟，等. 2002. 现代免疫学实验技术. 第二版. 武汉：湖北科学技术出版社.

王栩，林金明. 2007. 化学发光免疫分析技术新进展. 分析试验室，26（6）：111～122.

尹东光，贺佑丰，刘一兵，等. 2003. 标记免疫分析技术的发展点评标记. 免疫分析与临床，10（1）：40～42.

朱承谟. 2002. 标记免疫分析技术进展. 标记免疫分析与临床，9（3）：176～179.

Frank L，Markova S，Remmel N，et al. 2007. Bioluminescent signal system：bioluminescence immunoassay of pathogenic organisms. Luminescence，22（3）：215～220.

Ichibangase T，Hamabe C，Ohba Y，et al. 2006. Study on immunocapture-chemiluminescence assay of lipase activity in a biological sample. Luminescence，21（1）：62～66.

Kricka L J. 2003. Clinical applications of chemiluminescence. Analytica Chimica Acta，500（1/2）：279～286.

Li ZP，Li CH，Fan YS，et al. 2006. A chemiluminescent metalloimmunoassay based on silver deposition on colloidal gold labels. Anal Biochean，359（2）：247～252.

Roda A，Pasini P，Mirasoli M，et al. 2004. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. Trends Biotechnol，22（6）：295～303.

Saerens D，Frederix F，Reekmans G，et al. 2005. Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. Anal Clam，77（23）：7547～7555.

第十六章　免疫磁珠技术

免疫磁珠技术是免疫学原理与磁分离技术结合的样品分离方法。磁分离技术利用磁场实现磁珠标记样品和磁珠非标记样品的分离，其核心是磁珠即磁性微球。磁性微球是磁性粒子与高分子材料组成的小分子球体，大部分磁性微球内部是一个磁核，外层为高分子材料层，能结合多种活性基团，并通过这些活性基团与抗体等配基偶联，进而与待分离样品（如细胞）上特异性抗原直接或间接结合，在磁场的作用下实现样品的分离。由于磁性微球体积小、比表面积大、具有超顺磁性，在外磁场的作用下样品的分离十分简单，无需离心、过滤等复杂操作。与其他的样品（细胞）分离技术，如密度梯度离心、玫瑰花结和流式细胞仪分选相比，免疫磁珠分离的细胞纯度高（可与流式分选相当），且技术简便易行、细胞得率高、分离速度快；免疫磁珠分离技术的优势还在于整个操作过程对细胞的影响小，分离后的细胞状态良好，有利于后续实验操作。因此，免疫磁珠技术广泛用于各种细胞的标记与分离，从小规模实验室研究到大规模临床应用；另外，免疫磁珠技术也有效地用于 DNA、RNA 和蛋白质等生物分子的分离；在微生物检测、靶向释药系统、固定化酶等方面也有广泛的应用。本章首先简单介绍磁性微球的结构、特性和制备方法，然后介绍抗体与磁性微球偶联而成的免疫磁性微球，并介绍免疫磁性微球在医学上的应用，特别是免疫磁珠技术分离细胞的流程和策略。

第一节　磁性微球

一、磁性微球的组成

磁性微球由磁性材料和高分子材料两大部分组成。

1. 磁性材料

构成磁性微球的磁性材料多为 Fe、Co 和 Ni 等金属及其氧化物，如 Fe_3O_4、γ-Fe_2O_3、$MeFe_2O_3$(Me=Co、Mn、Ni)、铁钴合金（Fe-Co 和 Ni-Fe）等。其中最常用的是铁及其氧化物（Fe、Fe_2O_3 和 Fe_3O_4 等）。这些材料具有较好的磁响应性：在外界磁场作用下，迅速磁化，外界磁场撤除后，磁性快速消退，无剩磁。因此磁性微球仅在磁场中表现出磁性，当含目的样品的混合物与磁性微球在试管中混合时，磁性微球通过其偶联的配基与目的样品特异性结合，然后在试管一侧施加强磁场，磁性微球能迅速发生力学迁移并吸附在靠近磁场的试管内壁，结合样品的磁性微球即可从混合物中分离出来。撤除磁场后，样品经洗脱即可与磁珠分离。

2. 高分子材料

组成磁性微球的骨架材料通常选用性质稳定、强度高、无毒副作用的高分子材料或

无机材料。无机材料如氧化硅；高分子材料包括人工合成的高分子材料和天然高分子材料。人工合成高分子材料如聚苯乙烯、聚乙烯亚胺、聚乙烯醇和硅烷等。天然高分子材料有明胶、白蛋白、聚赖氨酸、淀粉和多种聚糖如纤维素、葡聚糖、琼脂糖、壳聚糖等。这些材料可以单独应用也可以混合使用作为磁性微球的骨架。高分子材料表面可根据不同需要，修饰或结合一些活性基团，如—OH、—NH_2、—COH、—COOH 和—$CONO_2$等，使磁性微球能更好地结合抗体、受体、酶、核酸和药物等配基或活性分子。

二、磁性微球的分类

按结构不同，磁性微球分为以下三大类。

1. 核壳结构的磁性微球

核壳结构的磁性微球即以磁性粒子为核，外层为高分子材料聚合物；或高分子材料为核，外层为磁性材料。

2. 多层型结构的磁性微球

多层型结构的磁性微球也称壳-核-壳结构，即内核为高分子聚合物，中间为磁性材料，外层为高分子材料层。

3. 混合结构的磁性微球

混合结构的磁性微球即指将磁性材料分散于高分子材料聚合物中形成的微球。

磁性微球按其制备时所用的材料的不同，还可分为合成高分子微球、生物高分子微球、无机微球等。合成高分子微球如磁性粒子与苯乙烯单体聚合形成的苯乙烯磁性微球。生物高分子微球是磁性粒子与生物大分子聚合得到的磁性微球，如牛血清白蛋白磁性微球、葡聚糖磁性微球等。无机微球通过无机盐共沉淀法制备，如 $MgFe_2O_4$ 纳米无机微球。

三、磁性微球的特点

理想的磁性微球应具备以下特点：粒径均匀，大小合适，比表面积大，吸附能力强；具有超顺磁性；悬浮稳定性好，不易沉淀；表面含多种表面活性基团；理化性质稳定，具有较好的生物相容性，对细胞或机体损伤小。

由于其表面的环氧基和氯甲基非常活泼，环氧基化和氯甲基化的磁性微球可以不需连接其他活性基团而直接与生物配基（如抗体等）偶联，较含其他功能基团的磁性微球使用更方便、应用较广泛。

四、磁性微球的制备

磁性微球的制备方法较多，主要包括共沉淀法和聚合法。

1. 共沉淀法

共沉淀法即将高分子物质与磁性材料混合，在碱性条件下搅拌，磁性材料合成为磁性粒子后被高分子材料包裹，形成高分子磁性微球。例如，将壳聚糖的溶液和铁盐、亚

铁盐溶液混合，剧烈搅拌下，加入碱性溶液（如氨水），可制备壳聚糖磁性微球。天然高分子磁性微球一般采用此方法制备而成。

共沉淀法是早期制备磁性微球常采用的方法，技术简单、易于操作；但是获得的磁性微球的粒径不均匀、大小不易控制、形状不规则、磁含量相差较大、磁响应性也较差，实验操作中进行样品分离时需强的外磁场，因此实际应用受到很大限制。

2. 聚合法

聚合法制备磁性微球的步骤是先合成磁性粒子，然后将磁性粒子均匀分散到高分子单体溶液中，在引发剂、稳定剂等作用下，高分子单体在磁性粒子表面聚合形成高分子聚合物。合成高分子材料作为骨架的磁性微球多用此法。由于磁性粒子为亲水性物质，所以亲水性单体容易在磁性粒子表面聚合；而疏水性高分子单体需对磁性粒子进行处理或调整聚合体系的有机相组成，才能使其在磁性粒子表面进行聚合。聚合法制备的磁性高分子微球大小均匀、磁含量均一、磁响应性一致、悬浮稳定性好。但聚合法制备方法复杂，有时磁性微球表面不含功能活性基团，使用前需使磁性微球表面带上活性基团。

聚合法包括悬浮聚合法、分散聚合法和乳液聚合法等。悬浮聚合法借助高速搅拌作用形成磁性微球，不加乳化剂。喷雾式聚合法用喷雾装置替代传统聚合法的机械搅拌，磁性微球产物的磁含量和粒径更加均匀。分散聚合法借助引发剂、分散剂作用形成磁性微球，合成的微球粒径大，磁响应性强。乳液聚合法借助乳化剂等形成磁性微球，聚合速度快、磁性微球粒径均匀，由于制备过程中加入乳化剂，磁性微球产物中易残留乳化剂等杂质，使用前需增加洗涤等预处理过程。

第二节　免疫磁性微球

一、免疫磁性微球简介

免疫磁性微球（immunomagnetic microspheres，IMMS），又称免疫磁珠（immunomagnetic beads，IMB），是表面结合有抗体或其他活性配基的磁性微球。免疫磁性微球主要用于细胞等靶物质的分离，将免疫磁性微球与含靶物质的复杂混合物共同培养，IMB可通过抗原-抗体、配基-受体间的特异性结合，使靶物质与磁性微球相连，通过磁场时这种磁珠-靶物质复合物可被磁场滞留，从而与其他复杂组分分离开来。免疫磁性微球分离的靶物质包括细胞、核酸、蛋白质等。

二、免疫磁性微球的特点

免疫磁性微球是在磁性微球的表面引入活性基团，通过偶联反应将抗体等配基结合到磁性微球上，形成免疫磁性微球。由于与抗体等配基偶联，构成免疫磁性微球的磁性微球载体除需具备磁性微球的一般要求外，还应具备以下条件：磁性微球与抗体或链霉亲和素等配基结合牢固，且结合后不影响或改变抗体等配基原有的生物学特性和特异性等，保证免疫微球的识别的专一性。聚苯乙烯磁性微球强度高，表面易进行化学修饰，是比较理想的制备免疫磁珠的材料。

三、免疫磁性微球的制备

免疫磁性微球由磁性微球和抗体等配基结合而成，磁性微球与抗体的连接有共价结合和吸附结合两种方式。共价结合依靠磁珠表面的活性基团，如—CHO、—COOH 等，与抗体 Fab 段上—NH_2 共价反应。如磁珠表面无这些活性基团，磁珠也可非特异性吸附抗体，称为吸附结合，此时要求磁性微球具有较大的比表面积，抗体才能牢固结合。

四、免疫磁性微球的分类

磁性微球在磁场中受力与磁性粒子的大小成正比。目前用于细胞分离的免疫磁珠分为两大类——小磁珠和大磁珠，可根据不同的实验目的选择。

1. 大磁珠

大磁珠粒子直径为 1～5μm，粒径较大、溶液中悬浮稳定差、易沉淀，因此使用前及操作过程中应充分混匀；大磁珠比表面积小，吸附能力低，吸附的活性配基少；由于粒径较大，在磁场中磁力强，无需特殊的分离柱即可实现样品的有效分离；分离可在普通的试管中完成，分离速度快、过程简单、成本低；大磁珠体积较大，对细胞影响大，特别是阳性分选时需将磁珠与细胞解离，再进行后续实验。

2. 小磁珠

小磁珠直径约 50nm，体积小、粒径均匀、悬浮稳定性好、使用时无须预先混匀；具有超顺磁性；比表面积大，表面可吸附大量活性基团；但因粒径较小、在磁场中磁力较弱，分离样品需要借助特殊的分离柱，有较强的磁场才能有效分离样品，因此成本昂贵；由于磁力较弱，细胞分离速度也较慢。但小磁珠体积小，只有细胞体积的万分之一，对细胞表型和功能影响小，不影响细胞的后续培养和实验操作。

第三节　免疫磁性分离技术

免疫磁性分离技术的基本原理是用目的样品（或非目的样品）标记磁珠，在磁场中实现样品的分离。可直接从血、骨髓、组织细胞、培养物、食物、水、土壤等原始样品中纯化细胞、细胞器、核酸和蛋白质。方法简单、快速、兼容性好，可直接进行下游分析或检测。免疫磁珠分离技术应用广泛，从实验室到临床；从小量细胞分选到大规模细胞分离；从常规细胞到稀有细胞如干细胞、细胞亚群的分选；从手工分选到全自动分选。磁珠分选获得的细胞纯度与流式分选相当，但分离快速、细胞得率高。磁珠分选的优势还在于整个操作过程对细胞影响小，且能实现自动化、高通量分选。免疫磁珠现已商品化，性质稳定、使用方便、重复性好。常用的免疫磁珠供应商有 Miltenyi biotec、Stem cell、Invitrogen 和 Bangs laboratories 公司，可根据需要加以选择。

一、免疫磁性分离装置

免疫磁性包括永久超强磁铁和分离柱两种，其功能是在磁性分离过程中吸附磁性粒

子，快速分离和纯化磁珠标记的目标生物分子。磁铁和分离柱的型号多样，配合0.5ml、1.5ml微量离心管，15ml及50ml离心管或试管，甚至96孔或384孔培养板中样品的分离，满足不同实验需求。

大磁珠粒径较大，在磁场中磁力强，无需特殊的分离柱，可将普通的试管置于强磁铁磁场中实现磁珠标记样品的有效分离。小磁珠在磁场中磁力较弱，需借助特殊的分离柱，以产生较强的磁场才能有效分离细胞。分离柱中常充填钢丝棉（steel wool），磁场中钢丝棉可使小磁珠获得强大的磁力，未结合磁珠的样品直接流经分离柱，而磁珠标记的样品则滞留在分离柱钢丝棉中，洗涤去除非特异性结合样品后，将分离柱撤离磁场，小磁珠失去磁性，不能结合钢丝棉，磁珠连同标记的样品一起被洗脱出来。

二、免疫磁珠的标记方法

免疫磁珠与细胞的结合可以采取两种方法——直接法和间接法，相应的磁珠分为直标磁珠和间标磁珠。

1. 直标磁珠和直接标记法

特异性抗体通过物理吸附或共价结合直接连于磁性微球表面，称为直接免疫磁珠，如磁珠偶联的anti-CD14抗体。采用直接标记法时，将抗体偶联磁珠加入待分选细胞悬液中，磁珠特异性地与表达相应抗原的细胞结合，形成细胞-抗原-抗体-磁珠复合物，在外加磁场作用下，目的细胞滞留在磁场中，其他非目的细胞从磁场中流出，目的细胞得以分离。此方法快速、简单，特异性和细胞得率高，但灵敏度偏低，且每分选一种细胞就需要制备相应的磁珠偶联抗体。

2. 间标磁珠和间接标记法

间标磁珠即抗体不直接与磁珠偶联，而是通过anti-Ig等与磁珠偶联，如将anti-Ig与磁珠偶联制备anti-Ig偶联磁珠（简称anti-Ig磁珠）。实验时先将细胞与未标记的特异性一抗混合，使一抗与细胞特异性结合，然后加入磁性微球偶联的二抗（anti-Ig磁珠）。通过anti-Ig与一抗间的特异性结合anti-Ig磁珠间接地与靶细胞结合。由于与磁珠偶联的抗体是anti-Ig而非一抗，因此称为间标磁珠，相应的标记和分离方法则为间接标记法。与直接标记法相比，间接标记法适用于几乎所有的单克隆和多克隆一抗，比较灵活，无需逐个制备一抗偶联的磁珠。例如，用一种抗兔Ig偶联磁珠即可与所有兔来源的一抗结合，用于细胞的分离。有时，一抗可为生物素标记的抗体或者荧光素标记的抗体，而二抗为抗生物素偶联的磁珠（anti-生物素磁珠）或链霉亲和素偶联的磁珠（链霉亲和素磁珠），通过生物素和anti-生物素、生物素和链霉亲和素的特异性结合，磁珠与目的细胞相连，并且在生物素和链霉亲和素系统中，1分子链霉亲和素可以结合4分子生物素，具有放大效应，当目的细胞上抗原表达水平较低时，采用生物素-链霉亲和素磁珠可取得较好的分离效果。蛋白A或蛋白G包被于磁珠表面时形成蛋白A或蛋白G偶联的磁珠，在此系统中，细胞与特异性抗体结合，抗体的Fc段与蛋白A或蛋白G高亲和力结合，因此细胞可标上磁珠，且蛋白A/G磁珠亲和力较anti-Ig磁珠大。同样，可用荧光素标记抗体作为一抗结合目的细胞，用anti-荧光素磁珠进行标记，实

现目的细胞的分离。需注意的是，间接标记法增加了细胞的洗涤步骤，特异性也会有所降低。

间接法一般用于以下几种情况：①没有直标磁珠抗体时；②需用几种抗体同时去除多种细胞时；③目的细胞上特异性抗原分子表达水平低时。

三、免疫磁珠分选的方法

磁珠分选的策略包括阳性分选、阴性分选、复合分选（阴性分选后的阳性分选）等。

1. 阳性分选

运用特异性抗体偶联的磁珠，直接从细胞混合物中分离目的细胞的方法称为阳性分选（positive selection）。阳性分选中磁珠标记的细胞即为目的细胞，如采用 anti-CD14 磁珠分选 $CD14^+$ 巨噬细胞。阳性分选方法简便、快速，细胞得率和纯度都较高。

2. 阴性分选

用抗体偶联磁珠去除无关细胞，使目的细胞得以纯化和分离的方法称为阴性分选（negative selection）。阴性分选中免疫磁珠结合的细胞为非目的细胞。例如，分离 $CD4^+$ T 时，可通过 anti-CD8、anti-B220、anti-CD49b、anti-CD11b 和 anti-Ter119 去除 $CD8^+$ T 细胞、B 细胞、NK 细胞、DC、巨噬细胞、粒细胞等，获得 $CD4^+$ T 细胞。因此阴性分选适用于：①从细胞混合物中去除某种类型的细胞，如肿瘤细胞；②缺乏针对目的细胞的特异性抗体磁珠时；③抗体和目的细胞结合可能诱导细胞活化，影响后续实验时（如细胞功能分析）。

3. 复合分选

先用磁性标记非目的细胞，排除大部分非目的细胞，目的细胞初步富集后，再用阳性分选法分离。有时目的细胞含量特别低，直接阳性分选时，细胞得率和纯度较低，可先从细胞悬液中去除非目的细胞，在富集目的细胞的基础上，再进行阳性分选，常可取得较好的分离效果。

四、细胞与磁珠的解离

磁珠分选获得的细胞，特别是阳性分选的细胞有时需将磁珠从细胞上解离下来（对于大磁珠而言尤其重要），再进行后续实验和培养。目的细胞与磁珠的分离方法有以下几种。

1. 过夜培养法

此方法最为常用，将结合有磁珠的细胞置于含 10 %胎牛血清的培养基中，37℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养 16～24h，磁珠即可从细胞上脱落，再通过磁场去除游离的磁珠，即可获得裸细胞。

2. anti-Fab 抗体法

用 anti-Fab 抗体与磁珠偶联抗体竞争目的细胞，从而使磁珠偶联抗体与细胞解离，

再通过磁场去除磁珠，获得的细胞即为未标记的细胞。

3. 酶解法

用特殊的剪切酶使磁珠从细胞上解离下来，如木瓜蛋白酶和唾液蛋白酶。

第四节　免疫磁珠分选细胞实例

免疫磁珠法最常用于细胞的分离，又称为免疫磁珠细胞分离（immunomagnetic cell separation method）技术，免疫磁珠法分离细胞通常包括以下 3 个步骤：①免疫磁珠与细胞混合物的孵育，使磁珠与相应细胞结合。②磁场中，被磁性标记的细胞滞留在分离柱或试管中，而未标记的细胞则流出分离柱或位于上清中，因此，磁珠标记细胞与磁珠非标记细胞得以分离。③目的细胞的收获，当分选柱或试管移出磁场后，磁性标记细胞被洗脱出来。免疫磁珠法分离细胞操作简单、耗时短，不影响分选后细胞的活性，可处理大量样品，实现自动化处理和分析。克服了荧光激活细胞分选法（fluorescence activated cell sorting，FACS）中，仪器昂贵、设备复杂、处理量小、分离的细胞活性低的缺点，因此免疫磁珠细胞分离法在多种细胞的分离和纯化方面有很大的优势。

下面以分离人外周血 $CD4^+$ T 细胞为例介绍免疫磁珠细胞分离技术。免疫磁珠分离技术包括阳性分选和阴性分选，每种分选方法又有直接标记法和间接标记法。CD4 分子是 Th 细胞特征性表面分子，利用 anti-CD4 偶联磁珠特异性结合 T 细胞表面的 CD4 分子，在磁场作用下，可将 T 细胞直接从细胞混合物中分离。或者采用多种抗体混合的鸡尾酒抗体去除非 $CD4^+$ T 细胞（包括 $CD8^+$ T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、粒细胞、红细胞、NK 细胞等），获得 $CD4^+$ T 细胞。磁珠分选的细胞可用 FACS 鉴定分离效果和细胞纯度，流式检测阳性分选的细胞时，注意合理选用荧光抗体，荧光标记抗体针对的抗原表位应不同于磁珠分选时所针对的抗原表位。有条件时，可采用自动分选系统，细胞纯度和得率较手动分选高，且更稳定，但仪器价格昂贵，且需专人进行设备的调试和维护。

一、直标法阳性分选 $CD4^+$ T 细胞

免疫磁珠分选 $CD4^+$ T 细胞时，先用密度梯度离心法分离 PBMC，然后将 PBMC 与 anti-CD4 磁珠混合，待 anti-CD4 磁珠与 $CD4^+$ T 细胞结合后，将细胞加入位于磁场的分离柱中，由于 $CD4^+$ T 细胞与 anti-CD4 磁珠结合带有磁性，而滞留在分离柱中，非 $CD4^+$ T 细胞则流出分离柱，将分离柱撤离磁场，用洗脱液即可将 $CD4^+$ T 细胞从分离柱中洗脱出来。由于免疫磁珠分选时细胞浓度较高，分离过程中应注意充分混匀细胞，避免细胞团块堵塞分离柱，必要时过柱前可用筛网（30μm）过滤细胞团块，但须注意避免细胞的丢失（沾染 Tip 头或筛网），提高目的细胞的得率。

材料与试剂

外周肝素抗凝血

分离柱（Miltenyi Biotec）

磁珠分离架（Miltenyi Biotec）

PBS/EDTA，含 0.5%BSA 和 2mmol/L EDTA，pH 7.2，4℃

anti-CD4 磁珠（Miltenyi）

30μm 尼龙网（BD）

步骤

1）分离外周血单个核细胞（PBMC），计数细胞，选用合适的分离柱（以下以 MS 柱为例）。

2）将单个核细胞室温下 200*g* 离心 5min，弃上清，加入 PBS/EDTA 重复洗涤 1～2 次。

3）用 PBS/EDTA 重悬细胞，调整 PBMC 浓度至 1×10^8 个/ml。

4）取 PBMC 悬液 1ml，加入 0.2ml anti-CD4 磁珠。混匀，置 4℃冰箱，孵育 10～15min，使 anti-CD4 磁珠与 $CD4^+$ T 细胞特异性结合。

5）加入 10ml PBS/EDTA（PBS/EDTA 量为 anti-CD4 磁珠标记体积的 10～20 倍），室温下 200*g* 离心 10min，弃上清，洗去游离的 anti-CD4 磁珠。

6）重复洗涤 1 次，弃上清，加入 1ml PBS/EDTA 重悬细胞，备用。

7）按说明书将分离柱置于磁场中的磁珠分离架上，加入 1ml PBS/EDTA 到分离柱，使液体自然流尽，预洗分离柱。

8）将 30μm 尼龙网置于分离柱上，将 anti-CD4 磁珠标记的细胞悬液加入尼龙网中，使其通过尼龙网流入分离柱，待液体自然流尽后，用 1ml PBS/EDTA 洗涤分离柱 3 次，每次自然流尽。必要时可收集流穿液，其中含未被磁珠标记的细胞，即 $CD4^-$ 细胞。

9）将分离柱撤离磁场，加入 1ml PBS/EDTA，用针芯（plunger，试剂盒中提供）推尽液体，冲出并收集磁珠标记的目的细胞，即 $CD4^+$ T 细胞。

10）加入 10ml PBS/EDTA，室温下 200*g* 离心 5min，洗涤 $CD4^+$ T 细胞，用含血清的 RPMI-1640 培养基调整至合适浓度，备用。

二、间标法阴性分选 $CD4^+$ T 细胞

用免疫磁珠去除无关细胞，使目的细胞得以纯化的方法称为阴性分选。阴性分选获得 $CD4^+$ T 时，通过混合鸡尾酒抗体，即 anti-CD8、anti-B220、anti-CD49b、anti-CD11b 和 anti-Ter119 去除 $CD8^+$ T 细胞、B 细胞、NK 细胞、DC、巨噬细胞、粒细胞等，未标记细胞即为 $CD4^+$ T 细胞。此方法中一般采用 biotin 标记的上述抗体，然后用 anti-biotin 磁珠间接标记并阴性分选 $CD4^+$ T 细胞。

材料与试剂

外周肝素抗凝血

分离柱（Miltenyi Biotec）

磁珠分离架（Miltenyi Biotec）

PBS/EDTA，含 0.5%BSA 和 2mmol/L EDTA，pH 7.2，4℃

biotin 标记的 anti-CD8、anti-B220、anti-CD49b、anti-CD11b 和 anti-Ter119
anti-biotin 磁珠（Miltenyi）
30μm 尼龙网（BD）

步骤

1）分离外周血单个核细胞，用 PBS/EDTA 洗涤细胞，调整单个核细胞浓度至 1×10^8 个/ml，选用合适的分离柱（以 LD 柱为例）。
2）取 1ml 待分选单个核细胞悬液（1×10^8 个细胞），加入 0.2ml biotin 标记的混合鸡尾酒抗体，终浓度约为 5μg/ml。混匀，置 4℃冰箱，孵育 20～30min。
3）加入 10～20ml PBS/EDTA（10～20 倍标记体积），室温下 200g 离心 5min，弃上清，加入 0.8ml PBS 重悬细胞。
4）加入 0.2ml anti-biotin 磁珠，混匀，置 4℃冰箱，孵育 10～15min。
5）加入 10～20ml PBS/EDTA，室温下 200g 离心 5min，弃上清。重复洗涤细胞两次，弃上清。用 1ml PBS/EDTA 重悬磁珠标记的细胞。
6）按说明书将分离柱置于磁场中，加入 1ml PBS/EDTA 预洗分离柱，待液体自然流尽。
7）将一无菌的试管置分离柱下，将磁珠标记后细胞加入分离柱中，收集流穿液。待液体自然流尽后，用 PBS/EDTA 洗涤分离柱 3 次，每次自然流尽。收集每次的洗脱液，其中含未标记磁珠的细胞，即所需的 $CD4^+$ T 细胞。
8）将收集的 $CD4^+$ 细胞用 10ml PBS/EDTA 洗涤后，用培养基调整至合适浓度，备用。

注意事项

1）细胞不能超过分离柱的细胞载量，应根据细胞起始数量和目的细胞的丰度，选择相应规格的分离柱。操作中 PBS/EDTA 的用量也应相应调整。
2）PBS/EDTA 预冷至 4℃，磁珠标记等操作冰上进行。提高标记温度、延长标记时间，非特异标记会增加，影响目的细胞的纯度。
3）磁珠分选前去除贴壁细胞和死细胞；免疫磁珠标记时阻断 Fc 受体，可降低非特异性结合，提高目的细胞的纯度。
4）上分离柱前，充分混匀细胞，打散细胞团块，以免分离柱堵塞。
5）气泡易阻滞分离柱，应减少操作过程中包括 PBS/EDTA 洗液中的气泡。
6）标记后细胞悬液加入分离柱时，避免细胞悬液沿分离柱管壁流下，否则会影响细胞的纯度。
7）为提高目的细胞的纯度，特别是稀有细胞，阳性分选得到的细胞可再加入分离柱，重新进行洗涤和洗脱。

第五节　免疫磁珠分选策略的选择

细胞被磁珠标记后能利用磁场进行分离，根据实验目的、目的细胞的特征、表面抗

原的表达情况和实验条件，合理选择和运用不同的细胞分选策略，是实验成功的关键。

一、灵活运用阳性分选和阴性分选

阳性分选时目的细胞被磁珠标记，分选速度快，细胞得率和纯度高。阴性分选通过去除无关细胞使目的细胞得以纯化或富集，当没有合适的抗体偶联磁珠用于目的细胞阳性分选时，可采用阴性分选策略，与阳性分选相比，阴性分选所用的磁珠量较多，当细胞混合物中无关细胞的种类和数量较多时，更加明显，因此阴性分选消耗的免疫磁珠和试剂较多，成本高，方法也比较复杂，且分选出的细胞纯度低于阳性选择。但阴性分选中免疫磁珠标记的细胞为无关细胞，目的细胞没有与抗体结合，避免了抗原-抗体结合可能诱导的细胞功能改变（活化或抑制），阴性分选中目的细胞能维持原有的结构和功能状态，特别适用于后续功能性实验研究。

如分离 $CD4^+$ T 细胞，可用 anti-CD4 磁珠阳性分选，也可通过“鸡尾酒”混合抗体去除非 $CD4^+$ T 细胞（包括 $CD8^+$ T 细胞、B 细胞、NK 细胞、DC、巨噬细胞、粒细胞等），获得 $CD4^+$ T 细胞。阳性分选法获得的 $CD4^+$ T 细胞纯度高，但阴性分选获得的是原始、静息状态的 $CD4^+$ T 细胞，避免了 $CD4^+$ T 细胞表面分子交联引发的 T 细胞状态的改变，适合于后续 $CD4^+$ T 细胞活化、增殖、诱导失能、信号转导、细胞因子分泌等的研究和进一步 T 细胞亚群的分离。但阴性分选时需多种抗体，因此选择何种分选策略，应根据实验目的和条件综合考虑。

二、灵活运用直接法和间接法分选

直接法中磁珠与特异性抗体偶联，目的细胞直接和与抗体偶联的磁珠结合，分选速度快、方法简单、特异性高，但灵敏度偏低，且每分选一种细胞就需要制备或购买一种抗体偶联的磁珠。例如，分离 $CD4^+$ T 细胞，采用 anti-CD4 磁珠；分离 $CD8^+$ T 细胞，需用 anti-CD8 磁珠。间接法中目的细胞通过特异性一抗与 anti-Ig 磁珠结合，或者通过生物素标记一抗与 anti-生物素磁珠结合。例如，分离 $CD4^+$ T 细胞，联合运用 anti-CD4 与 anti-Ig 磁珠，$CD4^+$ T 细胞通过 anti-CD4 与磁珠结合，此时 anti-CD4 为普通的单克隆或多克隆一抗。实际操作中，根据实验目的，可联合间接标记法和阴性分选策略：用鸡尾酒混合抗体阴性分选获得 $CD4^+$ T，即通过去除 $CD8^+$ T 细胞、单核细胞、B 细胞、NK 细胞和粒细胞，得到 $CD4^+$ T 细胞。由于鸡尾酒混合抗体种类较多，可采用间标系统，上述一抗分别与生物素偶联，然后用 anti-生物素磁珠阴性分离，获得 $CD4^+$ T 细胞。此时只需一种 anti-生物素磁珠即可，无须制备（或购买）多种抗体偶联磁珠，而且由于分离过程中没有采用 anti-CD4 抗体，避免了 CD4 抗体诱导的 T 细胞活化，可得到静息状态的 $CD4^+$ T 细胞。

三、灵活运用阴性分选后阳性分选

先阴性分选排除大部分非目的细胞，目的细胞初步富集后，再用阳性分选法分离。此策略主要用于细胞亚群的分离或者分离稀有细胞。分选细胞亚群时，其他无关细胞有时也表达用来阳性分选目的细胞的抗原表位，单纯采用阳性分选会影响目的细胞的纯

度，此时常先选定一种或多种非目的细胞上特异表达的抗原，针对这些抗原分子进行阴性分选，排除这些非目的细胞，然后再阳性分选目的细胞。

以 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞（regulatory T，Treg）的磁珠分选为例。Treg 表面表达 CD4 分子和 CD25 分子，CD25 也表达于活化的 T 细胞、DC 和 B 细胞表面，因此可先阴性分选获得 $CD4^+$ T 细胞，然后再阳性分选其中的 $CD25^+$ 细胞。操作时可采用间接标记法，联合 biotin 标记的 anti-CD8、anti-CD11b、anti-B220、anti-DX5、anti-Ter119 抗体和 anti-biotin 磁珠，去除非 $CD4^+$ T 细胞，然后用 anti-CD25 磁珠阳性法直接分选 $CD4^+$ $CD25^+$ T 细胞。或者用 PE-anti-CD25 和 anti-PE 磁珠间接法阳性分选 $CD4^+CD25^+$ T 细胞。为节省时间，可以在阴性分选加入 anti-biotin 磁珠的同时加入 PE-anti-CD25，阴性分选获得 $CD4^+$ T 细胞后，再加入 anti-PE 磁珠，阳性分选 $CD4^+$ $CD25^+$ T 细胞。由于分选获得的 Treg 细胞 CD25 分子已标记 PE 荧光素，分离后的 Treg 可直接用流式检测分析细胞的纯度，判断分选效果。或者利用生物素-链霉亲和素系统的放大效应，先用 biotin-CD25 特异结合 $CD25^+$ T 细胞，再用 PE-链霉亲和素结合 $CD4^+CD25^+$ T 细胞上的 biotin-CD25，最后用 anti-PE 磁珠将 $CD4^+CD25^+$ T 标记上磁珠，本方案分选的 $CD4^+CD25^+$ T 细胞纯度高，且重复性好，实验结果稳定。

同样，分离 iNKT（invariant NKT）细胞时，可采用阴性分选后阳性分选的策略。iNKT 表达特殊类型的 TCR，常规 T 细胞识别 MHC 分子提呈的抗原肽，iNKT 识别 CD1d 分子提呈的糖分子等抗原，如负载 α-GalCer 的 CD1d 分子，即 α-GalCer-CD1d 复合物（对应于抗原肽-MHC 复合物），因此可用 α-GalCer-CD1d 复合物特异性分离 iNKT 细胞。但是 α-GalCer-CD1d 复合物也能与某些 B 细胞结合，因此须先用 anti-B220 磁珠去除 B 细胞（B 细胞特异性表达 B220 抗原分子），然后用 α-GalCer-CD1d 复合物阳性分选其中的 iNKT 细胞。同样可联合 anti-PE 磁珠间标系统，用 PE 标记的 α-GalCer-CD1d 和 anti-PE 磁珠间接法阳性分选 iNKT，此时分选的 iNKT 已标记 PE 荧光素，可直接流式分析 iNKT 细胞的纯度。

阴性分选后阳性分选还可用于另一种情况，即低丰度细胞的分离，如 $CD138^+$ 浆细胞的分离，由于浆细胞丰度低，直接阳性分离 $CD138^+$ 浆细胞，效果不佳，根据浆细胞不表达 CD20 抗原分子的特点，为得到更好的分离效果，可先阴性分选 $CD20^+$ 细胞，再从 $CD20^-$ 细胞中阳性分离 $CD138^+$ 浆细胞。

四、双阳性细胞的分离

磁珠分选不能直接进行二次阳性分选，必要时，可在第一轮阳性分选后，用特殊的酶将磁珠从细胞上剪切下来，然后进入下一轮阳性分选。二次阳性分选策略与阴性分选后阳性分选的策略相比，所需抗体的种类少。如分选 $CD4^+CD25^+$ T 细胞，首先用 anti-CD4 磁珠阳性分选获得 $CD4^+$ T，用特殊的酶切除磁珠，然后用 anti-CD25 磁珠即可阳性分选获得 $CD4^+CD25^+$ T 细胞，整个过程只需 anti-CD4 磁珠和 anti-CD25 磁珠两种免疫磁珠，而且分离的 $CD4^+CD25^+$ T 纯度高，但有可能引起 $CD4^+CD25^+$ T 细胞的活化或功能变化。

总之，磁珠分选首先考虑阳性分选，这种方法分选细胞速度快，特异性好，细胞得

率和纯度高。如果不适合用阳性分选法，如细胞可能会被抗体激活，或者无特异性抗体磁珠等，可采用阴性分选，用磁珠标记并去除非目的细胞，富集和纯化目的细胞。对于分选非常稀有的细胞，也可先去除非目的细胞后阳性分选，提高细胞的分离效果。

第六节　免疫磁珠在医学上的应用

免疫磁性微球表面通过改性可连接具有不同生物活性的配基（如抗体、寡核苷酸等），根据偶联的配基不同，可用于细胞分离和纯化、蛋白质或多肽的分离与纯化、核酸的分离和纯化、微生物的检测、靶向释药系统的载体等。

一、细胞分离和纯化

使用免疫磁性微球进行细胞分离有两种方式：直接从细胞混合液中分离出靶细胞的方法，称为阳性分选；用免疫磁珠去除无关细胞，使目的细胞得以纯化的方法称为阴性分选。磁珠分选与流式分选获得的细胞纯度相当，但磁珠分选所需时间短、细胞得率高；分选过程对细胞影响小，分离后的细胞（特别是小磁珠分选的细胞）可直接用于后续实验，广泛应用于多种细胞的分离。

免疫磁珠技术可用来分离、纯化多种细胞，如红细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、神经干细胞、造血干细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞、NK 细胞、单核细胞、关节滑膜细胞、内皮细胞和多种细胞亚群（记忆性 T 细胞、调节性 T 细胞、pDC、DC 亚群等）。

在临床利用骨髓移植治疗白血病时，如采用自身骨髓移植，可用免疫磁珠分选法清除骨髓中的癌细胞，降低白血病的复发；如采用异体骨髓移植时，也可用免疫磁珠分选法清除骨髓中的 T 细胞，防止移植抗宿主病的发生。运用免疫磁性微球清除癌细胞的操作简单，方法安全、效果好，可清除绝大部分肿瘤细胞，对正常细胞的损害极小，因而得到广泛应用。免疫磁性微球分离技术还被用于从母体外周血中分离胎儿细胞进行无创性产前诊断。

免疫磁性微球分离技术用于分离杂交瘤细胞时，根据杂交瘤细胞分泌特异性抗体（Ig）的特点，选用相应的 anti-Ig 磁珠，直接法分离所需的杂交瘤细胞，避免了常规采用的有限稀释法的繁杂过程，操作简单、快速、特异。

二、蛋白质或多肽的分离与纯化

免疫磁珠可用于从血清、腹水、细胞培养上清、细胞裂解液中分离或纯化蛋白质和多肽。通过对磁性微球表面进行改性，共价结合某些能被目的蛋白或多肽识别和可逆结合的配基，利用配体-受体间特异性结合，在磁场作用下，实现蛋白质或多肽样品的分离。传统的蛋白质分离方法，如盐析、有机溶剂沉淀法、离子交换和层析等技术，一般是通过改变蛋白质溶液的 pH、温度或者是离子强度等来达到分离蛋白质的目的，操作过程比较繁琐，对蛋白质活性影响较大，蛋白质容易损失。免疫磁性微球的粒径小，表面含有活性基团，比表面积大，偶联容量大，与传统蛋白质分离方法相比较，免疫磁珠

分离技术不需对蛋白质混合物的 pH、离子强度等进行调整，避免了传统分离过程中蛋白质的失活和变性，分离的蛋白质能较好的维持其原有的构象和生物学活性；而且免疫磁珠分离技术方法简单、快速、特异性强、分离纯度高。

蛋白质的免疫磁珠纯化法中，一般采用粒径为 3.5μm 的大磁珠，结合容量高、结合力强。链霉亲和素磁珠可通过高效结合生物素标记的抗体，纯化与生物素抗体结合的特异性蛋白质抗原，可应用于蛋白质的分离和纯化。

金属螯合磁珠亲和纯化是另一种纯化 His-融合蛋白和多肽的方法。在磁珠表面共价结合 Ni^{2+}，形成螯合 Ni^{2+} 的亲和磁珠，利用 Ni^{2+} 与融合蛋白 His 之间的相互作用，将目的蛋白质特异性地吸附到 Ni^{2+} 磁珠表面。再用强磁铁将结合 His-融合蛋白的磁珠从细胞裂解液混合物中分离出来，洗涤后撤离磁场，加入含咪唑的洗脱液，His-融合蛋白即从 Ni^{2+} 磁珠上解离下来，再置于磁场中时，Ni^{2+} 磁珠被吸附，上清中即含所纯化的 His-融合蛋白。整个流程分为吸附、洗涤和洗脱 3 个步骤，简化了常规蛋白质纯化的操作步骤，缩短了分离时间，尤其适合于微量细胞裂解液中 His-融合蛋白的快速分离和重组菌的高通量筛选。以下介绍其具体过程。

材料与试剂

细菌裂解上清（含待纯化 His-融合蛋白）

Ni^{2+} 磁性微球

磁分离架

涡旋混合器

洗涤液

洗脱液

步骤

1）4℃下 10 000*g* 离心 15min，收集细菌裂解上清。

2）在新 1.5ml 离心管中，加入 100μl Ni^{2+} 磁珠悬液和 300μl 细菌裂解上清，混合，室温放置 15min。

3）将离心管置于磁分离架上，待悬液变澄清后，用吸管或移液器吸弃上清，此时 Ni^{2+} 磁珠被吸附至磁铁侧的离心管壁上。

4）从磁分离架上取出离心管，加入 300μl 洗涤液，涡旋混合，室温放置 5min，洗涤磁珠。

5）将离心管再次置于磁分离架上，待悬液变澄清后，用吸管或移液器吸弃上清。

6）加入 200μl 洗涤液，重复洗涤 3 次，充分洗去非特异性结合的蛋白质。

7）加入 200μl 洗脱液，涡旋混合，室温放置 5min，His-融合蛋白从 Ni^{2+} 磁珠上解离。

8）将离心管置于磁分离架上，使 Ni^{2+} 磁珠贴壁，吸取上清，其中含纯化的 His-融合蛋白。

注意事项

1）根据裂解液中的 His-融合蛋白的浓度选择合适用量的 Ni^{2+} 磁珠，100μl Ni^{2+} 磁

珠的蛋白质结合量为100μg His-融合蛋白。

2）可重复上述洗脱——Ni^{2+}磁珠分离操作，吸取上清，得到第二批纯化的His-融合蛋白。

3）若His-融合蛋白的得率较低，可调整Ni^{2+}磁珠用量或延长吸附时间。

4）可在裂解液中加入蛋白酶抑制剂，防止His-融合蛋白降解。

5）His-融合蛋白洗脱不完全时，可增加洗脱液中的咪唑浓度。

三、核酸的分离和纯化

传统的核酸分离技术如密度梯度离心和凝胶电泳等涉及有机溶剂萃取、沉淀和离心等步骤，操作繁琐、耗时长、不易自动化，而且操作者在实验过程中接触有毒试剂。免疫磁性微球分离核酸的原理是基于碱基互补配对的原则，将磁性微球与特异核苷酸序列偶联，利用碱基互补配对，样品溶液中的对应核酸吸附到免疫磁珠表面，在磁场作用下将结合有核酸的磁珠得以分离，洗涤并去除非特异结合后，加入洗脱液使核酸从免疫磁珠上解离下来，即得到所需的核酸。因此，与传统的核酸纯化技术相比，免疫磁性分离技术简单快速、特异性高、核酸回收效率高，不仅可以在试管中进行，也可以在96孔板中进行自动化操作，通量高，减少了样品损失与污染。例如，偶联Oligo（dT）的磁性微球可以快速地纯化mRNA。也可在DNA合成过程中，用生物素化的引物或用Klenow聚合酶对目的核酸末端进行生物素标记，将生物素插入目的核酸中，然后利用链霉亲和素磁性微球，通过链霉亲和素-生物素间高效特异性结合，使磁珠与目的核酸相连。而且由于链霉亲和素-生物素之间的结合力非常强，核酸分离过程中解链、杂交等都不会破坏目的核酸和磁珠之间的连接。磁珠分离的核酸可直接进行下游的PCR或文库构建等。

以下以磁性微球分离mRNA为例具体介绍。Oligo（dT）磁珠表面结合Oligo（dT）寡核苷酸序列，可以与mRNA上的poly（A）特异性碱基配对结合，使mRNA有效地与其他RNA等杂质分离。由于碱基间结合速度很快且特异，Oligo（dT）磁珠分离mRNA可在1h内完成，此方法操作简单、回收效率高，对mRNA影响小，纯化后的mRNA可直接用于后续实验，可实现自动化和高通量检测。

四、微生物的检测

免疫磁性微球在食品卫生检疫、环境检测等方面具有重要的意义，目前已广泛用于病原菌、原虫及病毒等微生物的检测和分离。采用免疫磁珠分离待检样品中目的微生物的过程一般包括3个步骤：①磁珠与特异抗体的偶联。大肠杆菌、隐孢子虫等病原微生物已有商品化的一抗偶联磁珠，可直接购买。②待检样品与一抗偶联磁珠混合，孵育一段时间，形成免疫磁珠-病原微生物复合物。③将样品置于磁场中，使免疫磁珠-病原体微生物复合物吸附在磁铁侧的试管壁上，复合物经洗涤后加入洗脱液，使目的微生物与磁珠分离。结合于磁珠上的目的微生物可以不经洗脱直接在显微镜下观察，或进一步培养。免疫磁珠技术分离目标微生物特异性强，可快速分离目的微生物，同时还可去除待检样品中的抑制性因子，有利于目的微生物的后续培养；或者将免疫磁珠分离技术与其

他检测方法，如 ELISA、PCR 等结合起来，提高分析的灵敏度。

五、靶向释药系统的载体

磁性微球与药物偶联，作为靶向释药系统的载体，服用这种磁性微球药物后，在外加磁场下，通过磁性微球的导航，将药物集中到病变区，提高了药物疗效，减少全身用药剂量，减少了全身毒副作用。制备免疫磁性药物微球的药物包括单克隆抗体、酶或免疫毒素；作为靶向释药系统的载体应无毒、生物相容性好、对机体损伤小、在体内可降解；磁性微球的大小应为 10～20μm，过大容易堵塞血管，过小（1～3μm），磁珠靶向定位效果不好。

第七节　结　　语

样品分离技术是生物技术领域最重要的技术之一，免疫磁性微球通过与生物活性配基如抗体、生物素、寡核苷酸等偶联，在磁场作用下，实现磁珠标记样品的快速分离。免疫磁珠分离技术整合了免疫学反应的高度特异性和磁性分离的快速、简单等优点，广泛用于细胞、核酸、蛋白质等的分离纯化、靶向释药、微生物检测等。分离的样品可直接培养或与下游多种分析和检测技术连接，如进一步流式分选或进行层析、电泳和 PCR 扩增等。免疫磁性微球分离技术快速、简单、特异，在生物分离领域具有广阔的应用前景。目前基础研究和临床中使用的免疫磁性微球多为国外公司开发的产品，价格昂贵，国内在这方面的研究和开发有待于进一步发展。如何开发出粒径均一、磁顺应性好、悬浮稳定性佳的磁性微球，如何提高生物配基与磁性微球结合的效率和稳定性，如何进一步扩展免疫磁性微球的应用范围，这些都是磁性微球领域关注的重点。相信不久的将来，通过人们的不断努力，免疫磁性微球分离技术在医学乃至整个生命科学领域将发挥更大的作用。

（徐红梅）

参 考 文 献

Dumétre A，Dardé ML. 2005. Immunomagnetic separation of Toxoplasma gondii oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. J Microbiol Methods，61 (2)：209～217.

Fillola G，Muller C，Bousquet R，et al. 1996. Isolation of bone marrow plasma cells by negative selection with immunomagnetic beads. J Immunol Methods，190 (1)：127～131.

Hardingham JE，Kotasek D，Farmer B，et al. 1993. Immuno bead-PCR：a technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. Cancer Res，53 (15)：3455～3458.

Haukanes BI，Kvam C. 1993. Application of magnetic beads in bioassays. Biotechnology (N Y)，11 (1)：60～63.

Kamala T. 2008. An optimized immunomagnetic bead-based negative selection protocol for CD4 T-cell isolation from mouse lymph nodes and spleen. Scand J Immunol，67 (3)：285～294.

Neurauter AA，Bonyhadi M，Lien E，et al. 2007. Cell isolation and expansion using Dynabeads. Adv Biochem Eng Biotechnol，106：41～73.

Rasmussen AM，Smeland EB，Erikstein BK，et al. 1992. A new method for detachment of Dynabeads from positively selected B lymphocytes. J Immunol Methods，146（2）：195～202.

Stögbauer F，Neumeier M，Weigert J，et al. 2008. Highly efficient and low-cost method to isolate human blood monocytes with high purity. J Immunol Methods，337（1）：78～80.

Wang SY，Makl KL，Chen LY，et al. 1993. Elimination of malignant tumor cells from human bone marrow using monoclonal antibodies and immunomagnetic beads. Anticancer Res，13（6A）：2281～2285.

Widjojoatmodjo MN，Fluit AC，Torensma R，et al. 1993. Comparison of immunomagnetic beads coated with protein A，protein G，or goat anti-mouse immunoglobulins. Applications in enzyme immunoassays and immunomagnetic separations. J Immunol Methods，165（1）：11～19.

Zborowski M，Chalmers JJ. 2005. Magnetic cell sorting. Methods Mol Biol，295：291～300.

第十七章　PCR 和定量 PCR

第一节　PCR 技术的基本原理和操作

一、基本原理

PCR 的基本工作原理是以拟扩增的 DNA 分子为模板，以两段分别与模板互补的寡核苷酸片段为引物，在 DNA 聚合酶的作用下，按照半保留复制的原则沿着模板链延伸直至完成新的 DNA 合成（图 17-1）。整个过程由变性（denaturation）-退火（annealing）-延伸（elongation）3 个基本反应步骤构成：①模板 DNA 变性。将体系加热至 95℃左右一定时间后，模板 DNA 互补双链解链为单链，以便与引物结合，为下一轮反应做准备。②模板 DNA 与引物退火。体系温度降至一定程度（一般以 55℃为初选），引物即与模板 DNA 单链上的互补序列配对结合。③引物延伸（一般为 72℃）。在 DNA 聚合酶作用下，模板 DNA 上的引物以 dNTP 为原料，按照碱基互补配对和半保留复制的原理，合成一条与模板 DNA 互补的新链。

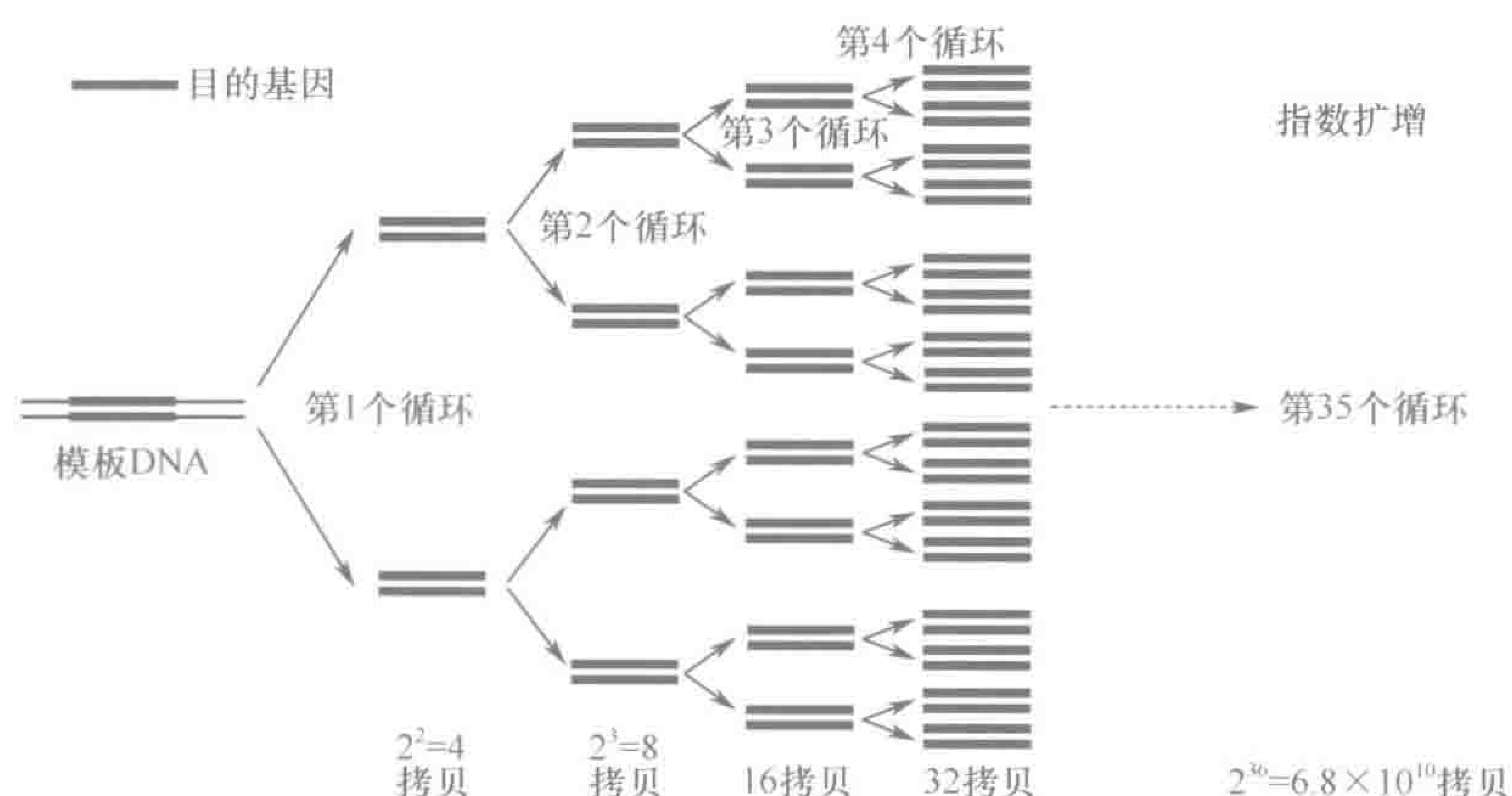


图 17-1　PCR 的基本原理

在进行以上三步的一个循环后，目的 DNA 片段增加 1 倍。因为新合成的 DNA 也可作为模板，因而随着 PCR 循环的进行，DNA 合成量可呈指数增长，即 2^n（n 为循环次数）。从理论上讲，一个 DNA 分子经过 35 次循环后，就可以扩增到 3000 万倍以上。但实际上，由于底物的减少、产物的增加、产物本身复性、酶的疲劳消耗等各种原因，整个扩增将进入线性增长或平台期，此时扩增产物将不再呈指数增加，出现“停滞效应”（图 17-2）。

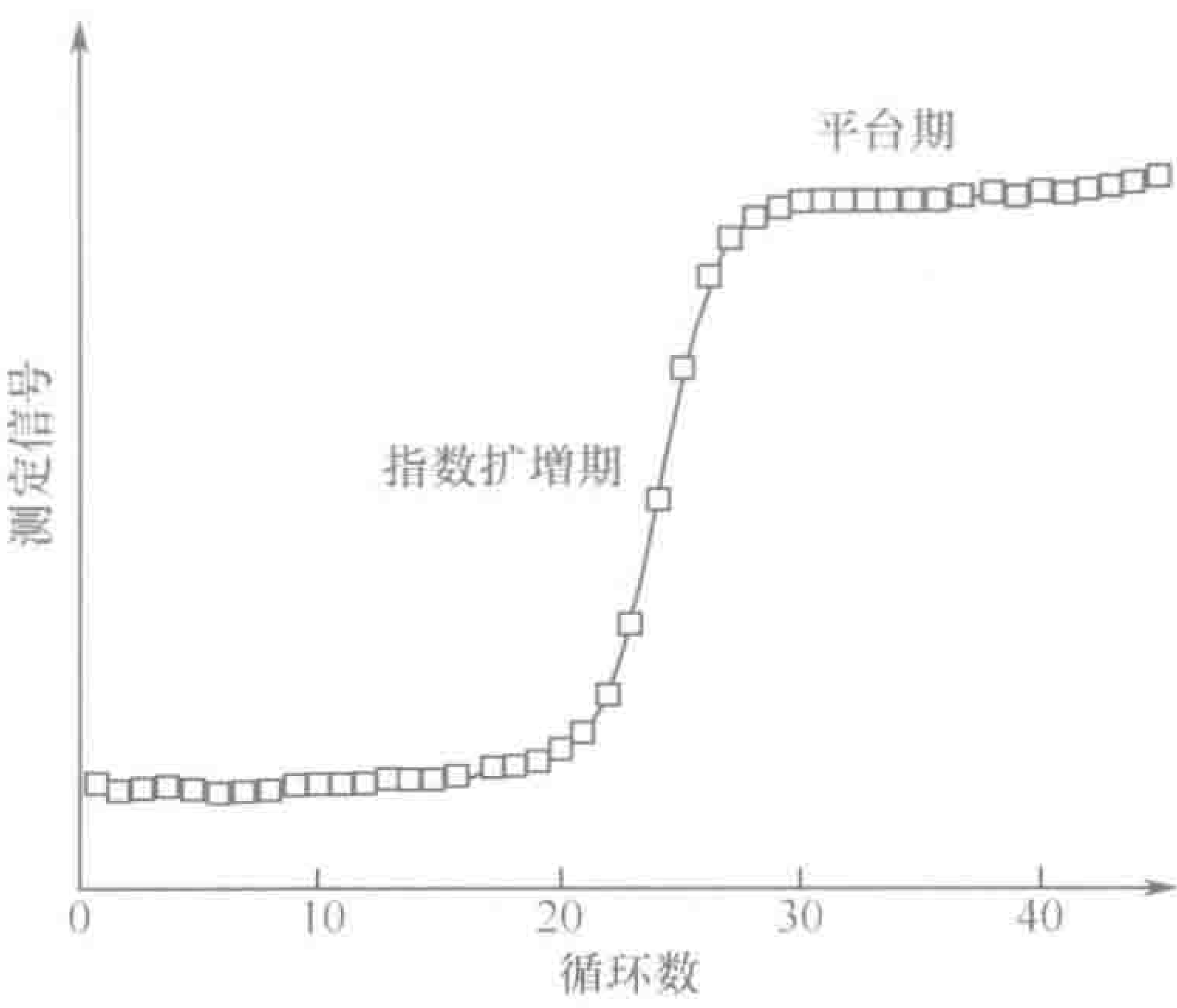


图 17-2　PCR 动力学

二、扩增体系

标准 PCR 扩增体系的组成见表 17-1。

表 17-1　标准 PCR 扩增体系的组成

成分	终浓度
模板	10^4～10^6 个 DNA 模板
引物	各 0.1～0.5μmol/L
反应缓冲液	1×
Mg^{2+}	1.0～3.0mmol/L
dNTP	各 200μmol/L
DNA 聚合酶	1～4U/100μl 体系

（一）模板

几乎所有形式的 DNA 和 RNA 都能作为 PCR 反应的模板，如基因组 DNA、质粒 DNA、噬菌体 DNA、逆转录的 cDNA、mRNA 等。PCR 反应对模板的纯度要求不是很高，但样品中的某些成分（如细胞中的蛋白质和脂类、细菌的菌种保护剂等）对 PCR 反应有抑制作用。

（二）特异性引物

引物不但决定 PCR 产物的长短，也是决定 PCR 扩增特异性的关键。理论上，任何模板 DNA，只要序列是已知的，就能够按照其序列设计成一定长度的互补寡核苷酸链做引物，达到在体外大量扩增特定长度靶序列的目的。

标准 PCR 引物设计的一般原则包括：

1）长度：18～30bp，上下游引物长度差别小于 3bp。

2）碱基组成：G+C 含量应在 40%～60%，A、T、G、C 随机分布。扩增高 GC

含量的模板，建议使用高解链温度（T_m）(如 75～80℃）的引物。

3）避免出现重复基序（repeat motif)：如 4bp 或以上的简单重复、反向互补/自身互补、多聚核苷酸成串排列及两条引物间的互补。

4）3′端：3′端（尤其是最末端两个碱基）必须严格配对，一条引物的 3′端不能结合到另一条引物的任何位点上。每条引物的 3′端碱基最好为“G”或者“C”，易于形成所谓的“GC 夹子”(GC clamp)，提高引发效率。

5）T_m 值：理想引物的 T_m 值应在 55～60℃。两条引物间的 T_m 值差异不应超过 2～3℃，扩增产物与引物的 T_m 值差异不能大于 10℃。退火温度通常选择低于 T_m 约 5℃。

为了节省时间和减少 PCR 过程中的问题，可以使用计算机软件进行引物设计、选择和优化。常用的软件有 Primer Premier 5（PREMIER Biosoft International）及Primer Designer 4.1 等。

（三）热稳定 DNA 聚合酶及其浓度

一个典型的 PCR 扩增所需酶量为 2.5U/100μl。常用的 *Taq* DNA 聚合酶便宜、高效，保真度也能满足一般试验要求。但对于要求保真度更高、扩增片段超过几千碱基对，如逆转录 PCR 和致突变 PCR 等，可选用其他高保真、长片段的 DNA 聚合酶，或一些商品化的、集中了不同聚合酶特点的“鸡尾酒”酶。

（四）脱氧核苷三磷酸的质量及浓度

标准 PCR 扩增体系（50μl）中每种脱氧核苷三磷酸（dNTP）的浓度一般为 200～250μmol/L，可以满足 6.0～6.5μg DNA 产物的合成。dNTP 的质量及浓度影响 PCR 的扩增效率。试验中通常将 dNTP 原料干粉配成高浓度（或者直接购买 dNTP 原液）后小量分装保存于－20℃，防止反复冻融产生降解。使用前混匀并短暂离心，用以收集蒸发后凝结于管壁的少量水，防止浓度的改变。

（五）离子浓度

热稳定性 DNA 聚合酶的活性依赖于游离二价阳离子的存在。目前通常采用 Mg^{2+}。由于 dNTP、模板 DNA 以及引物中的磷酸基团均能结合 Mg^{2+}，因此反应体系中的 Mg^{2+} 浓度必须超过上述物质来源的磷酸基团的摩尔浓度总和。通常当体系中每种 dNTP 浓度为 200μmol/L 时，Mg^{2+} 浓度为 1.5mmol/L。对于特殊的体系，如要提高保真度，可在此基础上降低 Mg^{2+} 浓度。

三、反应条件

标准 PCR 反应条件涉及温度、时间和循环次数。

（一）温度与时间

通常 PCR 的温度变化涉及变性（90～95℃)、退火（40～60℃）和延伸（10～

75℃）3 个阶段：①变性。模板 DNA 变性温度由其 G+C 含量来决定。变性时间则取决于模板 DNA 分子的长度。对于 *Taq* DNA 聚合酶，变性条件一般为 94～95℃、45s～1min。温度过高、时间过长会影响聚合酶活性；温度过低、时间过短则模板 DNA 分子解链不充分。当模板 DNA 的 G+C 含量>55%时，变性温度要更高。②退火。退火温度和时间取决于引物长度、碱基组成、浓度及模板 DNA 长度。一般引物长度 20bp 左右、G+C 含量约为 50%时，可采用 55℃作为最适退火温度的起点。一般退火温度可在比两条引物 T_m 值低 2～10℃的范围内，通过梯度 PCR 来确定最佳退火温度。如果为提高 PCR 特异性，可在允许范围内选择较高的退火温度，以便最大限度获得特异性产物。退火时间一般为 30～60s，以使模板与引物充分复性。③延伸。对于 *Taq* DNA 聚合酶，最适温度一般为 72～78℃，通常为 72℃。在这一温度下，*Taq* DNA 聚合酶的聚合速率约为 2000bp/min。延伸时间取决于待扩增片段的长度。1kb 以内的片段采用 1min 的延伸时间即可。

（二）循环次数

PCR 循环次数由反应体系中起始模板浓度和扩增效率决定。对于 *Taq* DNA 聚合酶，30 次循环后在包含 10^5 拷贝的靶序列的反应体系即可达到指数扩增期。循环次数越多，非特异产物越多。

（三）热启动 PCR 与 touch down PCR

为避免低于 T_m 值时发生的非特异性扩增，可以采用热启动 PCR 方法。实现热启动 PCR 的方法包括：①在 PCR 反应体系达到变性温度之后再加 DNA 聚合酶或 Mg^{2+}，此法的缺点是增加了操作步骤及污染发生的机会；②目前一项更有效的方法是在反应体系中加入抗 DNA 聚合酶的多克隆抗体，该抗体在 PCR 循环的混合和第一次升温期间，与 DNA 聚合酶特异性结合而有效抑制 DNA 聚合酶的活性，当达到变性温度时，抗体失活，DNA 聚合酶的活性被释放，PCR 反应开始。

touch down PCR（TD-PCR）通过在 PCR 仪上编定程序来实现对一个 PCR 反应体系进行一系列连续的退火温度下降的循环反应，退火温度的跨度范围在 15℃左右。退火温度一般从比理论上的退火温度高 5℃左右一直到比退火温度低 5℃左右。例如，理论上的退火温度为 60℃，在 TD-PCR 中退火温度热循环可以设定为从 65℃到 55℃，每隔一次循环比前一退火温度下降 1℃（即每摄氏度值下进行两个 PCR 循环），随后在 55℃进行 15 个左右的 PCR 循环。

TD-PCR 开始时，反应的退火温度高于估计的退火温度，随着循环的进行，退火温度逐渐降到估计的退火温度并最后低于这个温度水平。这一策略避免了在早期 PCR 循环中引物与模板之间的非特异性杂交，确保了早期 PCR 循环在引物与模板之间特异性进行，从而极大地消除了早期非特异配对扩增带来的干扰。

四、PCR 技术的基本操作

（一）常规 RT-PCR

常规的 PCR 是以 DNA 为模板进行指数扩增。由于绝大多数真核生物的结构基因由外显子和内含子组成，而且内含子序列较长，因此很难获得这些序列。即使能获得，也给后续分析带来很多不便。但真核生物 DNA 在转录过程中经剪切可将内含子部分去除，获得成熟的 mRNA，因此可经逆转录得到相应的 cDNA 作为 PCR 的模板，进行逆转录聚合酶链反应（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）。

RT-PCR 由两大步骤组成（图 17-3），一是逆转录，即通过提取细胞或组织中的总 RNA，以其中的 mRNA 为模板，利用 Oligo（dT）引物、随机引物或基因特异性引物和逆转录酶将 mRNA 逆转录成 cDNA 第一链；二是 PCR，即以 cDNA 第一链为模板，用特异性引物进行 PCR 扩增，从而获得目的基因。RT-PCR 具有灵敏度高、专一性好、简便快捷等优点，不仅是从真核生物中获得目的基因的重要途径，而且可有效地定量检测微量样品和低表达水平基因。

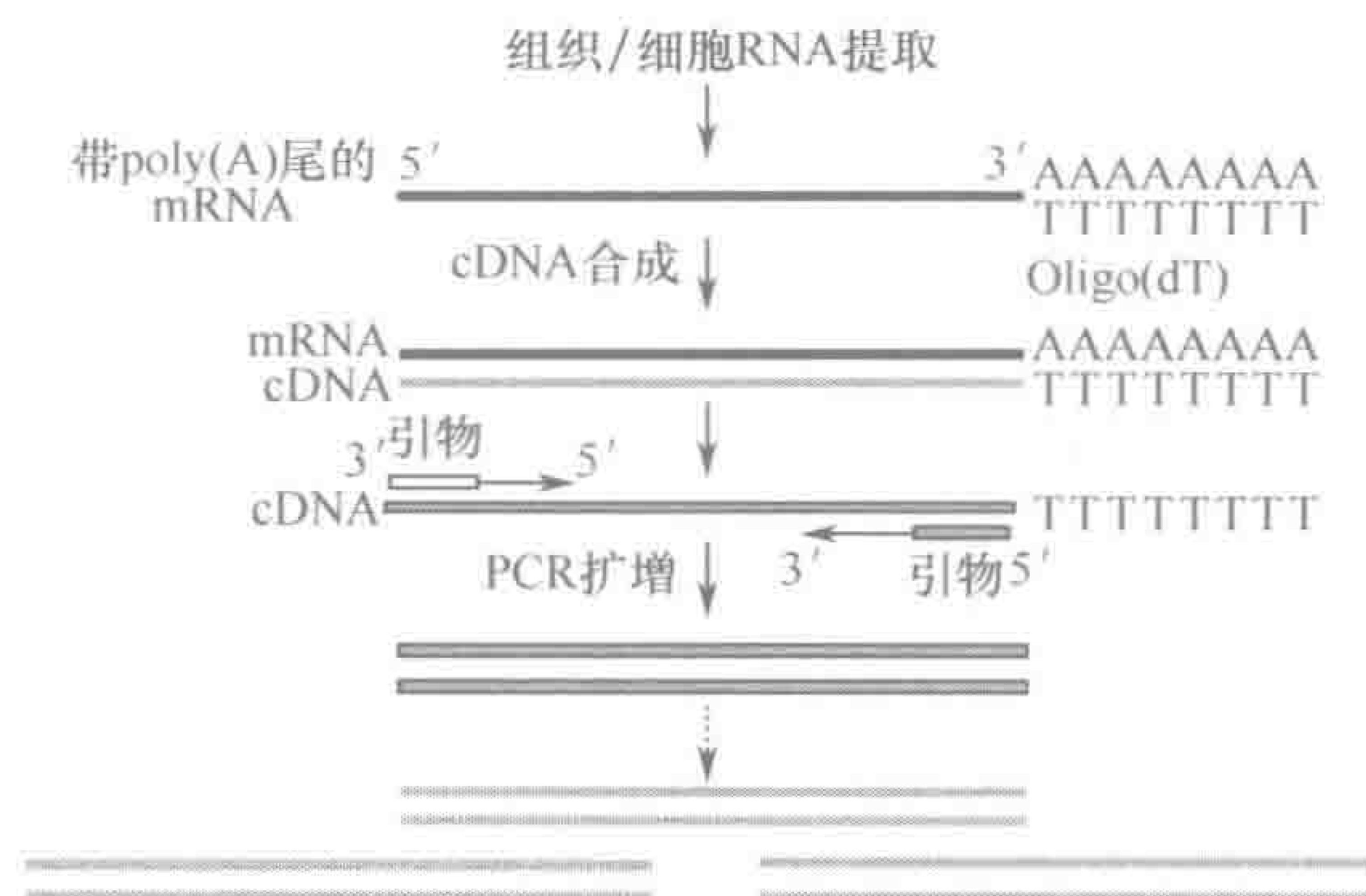


图 17-3　RT-PCR 的基本原理示意图

该技术主要用于以下几个方面。

1）直接克隆目的基因的 cDNA 序列。

2）定性或定量分析基因转录产物：如细胞中基因表达水平、RNA 病毒含量等。

3）半定量比较不同样品间 mRNA 的差异表达。

4）制备用于杂交的 cDNA 探针。

5）选择性剪接产物的检测。

6）5′cDNA 和 3′cDNA 末端快速克隆（rapid amplification of cDNA end，RACE）。

1. RNA 的提取

获得完整的 RNA 是 RT-PCR 等的前提。在 RNA 的提取过程中有 5 个关键：有效破碎样品细胞或组织；有效变性核蛋白复合体；有效抑制内源 RNA 酶；从 DNA 和蛋白质混合物中有效分离 RNA；有效除去多糖杂质（对于多糖含量高的样品）。其中最关键的是抑制 RNA 酶活性。由于 RNA 酶广泛存在而且相当稳定，反应也不需要其他辅

助因子，RNA制剂中只要存在少量的RNA酶就会引起RNA的降解。RNA酶可耐受多种处理而不被灭活，如煮沸、高压灭菌等。因此在实验中，一方面要严格控制外源性RNA酶的污染，如操作人员戴手套、口罩；所有玻璃器材利用200℃高温干烤去除RNA酶；所有试剂利用DEPC处理去除RNA酶；如果有可能尽量使用一次性无核酸酶的耗材等。另一方面要最大限度地抑制内源性的RNA酶，主要是应用RNA酶抑制剂。

许多公司（如Promega、Invitrogen、Qiangen等）出售RNA/mRNA分离和逆转录PCR试剂盒，并提供操作说明。现简要介绍总RNA和mRNA的提取及RT-PCR的操作步骤。

2. 总RNA的提取（以Invitrogen公司的Trizol试剂为例）

从哺乳动物细胞中提取RNA，首先要有效去除细胞裂解物中的DNA和蛋白质等杂质，其次要防止在提取过程中内源及外源性RNA酶对RNA的降解。1987年，Chomczynski等采用异硫氰酸胍-酚-氯仿抽提一步操作，成功地从培养细胞中分离出了高质量的RNA。从此以后，该一步法被广泛采用；其基本原理是高浓度的异硫氰酸胍能迅速溶解蛋白质，使组织或细胞破裂，并使核糖核酸酶快速失活，酚-氯仿抽提和离心可去除提取物中的蛋白质和DNA，由此得到的上清经异丙醇沉淀，即可得到细胞总RNA。

材料与试剂

Trizol试剂
液氮
氯仿
异丙醇
75%乙醇
无核酸酶的H_2O
研钵
电动匀浆器

步骤

1）组织/细胞裂解。组织样品：采用液氮研磨方法。组织块直接放入研钵中，加入少量液氮，迅速研磨，待组织变软，再加少量液氮，再研磨，如此3次，按50～100mg组织/ml的比例加入Trizol，用电动匀浆器充分匀浆需1～2min，转入离心管进行下一步操作。细胞样品：贴壁细胞无需消化，可直接按$10cm^2/ml$比例加入Trizol，用加样器吹吸几次进行消化、裂解。悬浮细胞可直接收集、裂解。

2）细胞或组织加Trizol后，室温放置5min，使其充分裂解。此时可放入－70℃长期保存。

3）12000r/min离心5min，弃沉淀。

4）按200μl氯仿/ml Trizol加入氯仿，振荡混匀后室温放置15min。

5）4℃下 12000g 离心 15min。

6）吸取上层水相，至另一离心管中。千万不要吸取中间界面；若同时提取 DNA 和蛋白质，则保留下层酚相存于 4℃冰箱，若只提 RNA，则弃下层酚相。

7）按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀，室温放置 5～10min。

8）4℃下 12000g 离心 10min，弃上清，RNA 沉于管底。

9）按 1ml 75%乙醇/ml Trizol 加入 75%乙醇，温和振荡，以悬浮 RNA 沉淀。

10）4℃下 8000g 离心 5min，尽量弃上清。

11）室温干燥或真空干燥 5～10min。

12）加 50μl H_2O，55～60℃放置 5～10min 以溶解 RNA 样品。

13）测 OD 值定量 RNA 浓度。注：此方法提取 RNA A_{260}/A_{280} 值为 1.6～1.8；产率一般为 1～10μg RNA/mg 组织，或 5～15μg RNA/10^6 个培养的细胞。

注意事项

1）1ml Trizol 可裂解 5×10^6 个动物、植物或酵母细胞，或 10^7 个细菌细胞。组织体积不能超过 Trizol 体积的 10%，否则匀浆效果不好。

2）组织或细胞量过少，可酌情减少 Trizol 用量；组织或细胞用量过多，会引起 DNA 对 RNA 的污染；高蛋白、脂肪或多糖类组织，肌肉组织或块状植物组织等，组织匀浆或液氮研磨后需 4℃下 12 000g 离心 10min 去掉不溶物，再进行下面操作，若顶层有脂肪物，也须去掉；热天提 RNA，必须戴手套，手是 RNase 的主要来源；组织块用液氮研磨效果最好，若没有液氮或电动匀浆器，可用手动匀浆器代替，此时组织块不宜过大，且需先用眼科剪刀将组织剪碎，然后再充分研磨。

3）提取出来的 RNA 样品不要过于干燥，否则很难溶解。

3. mRNA 提取（以 Promega 公司的试剂盒为例）

一步法提取的细胞总 RNA 中，大部分为 rRNA 和 tRNA，而分子生物学研究中的某些技术要求以 mRNA 为材料，如通过逆转录构建 cDNA 文库。因此，有时需要从细胞中分离 mRNA。mRNA 的提取采用亲和层析法，将 oligo（dT）引物连接于固相介质［如 oligo（dT）纤维素］，利用大多数真核细胞 mRNA 的 3′端含有多聚腺苷酸［poly（A）］尾巴的特点，将样品中的 mRNA 通过与 oligo（dT）形成稳定的 RNA-DNA 杂合链，吸附于固相介质上，通过洗涤去除不结合的杂质，最后用使杂合双链不稳定的缓冲液洗脱获得 mRNA。

材料与试剂

PolyATtract System 1000 RNA 分离系统，其中包含：

链亲和素磁性分离颗粒（streptavidin magne Sphere paramagnetic particles，SA-PMP）

GTC 抽提缓冲液

生物素化 Oligo（dT）探针（50pmol/μl）

稀释缓冲液

β-巯基乙醇（48.7%）

无核酸酶的水

0.5×SSC（由20×SSC稀释。20×SSC：3mol/L NaCl，0.3mol/L 柠檬酸三钠·$2H_2O$，用1mol/L HCl调pH至7.0）

PolyATtract System 1000 磁性分离架

PolyATtract System 1000 磁性分离架接头（适用于15ml离心管）

3mol/L 乙酸钠（pH5.2）

异丙醇

70%乙醇

小型组织匀浆器

步骤

1）每毫升GTC抽提缓冲液加41μl β-巯基乙醇，配制成GTC/BME缓冲液，其中β-巯基乙醇的浓度是2%。在50mg组织或2×10^6个细胞中加入400μl GTC/BME缓冲液，高速匀浆破碎细胞，至无肉眼可见的组织片存在。

2）每毫升稀释缓冲液加入20.5μlβ-巯基乙醇，配制成稀释/BME缓冲液，其中β-巯基乙醇的浓度是1%。向匀浆物中加入800μl 稀释/BME缓冲液，颠倒混匀，加入50pmol生物素化的Oligo（dT）探针，70℃退火5min。

3）将反应物转移到新管。室温12 000*g*离心10min，以去除细胞碎片和沉淀的蛋白质。取上清。

4）轻轻晃动装有SA-PMP的管，以彻底重悬SA-PMP。取600μl SA-PMP磁性颗粒悬浮液至于离心管中，用磁性架吸附后，收集磁性颗粒，重新悬浮于1ml 0.5×SSC中。

5）重复步骤4）3次。

6）将步骤3）中的上清与5）中1ml磁性颗粒混合，室温放置2min，利用生物素与亲和素结合的特点，将mRNA捕获到磁性颗粒上。

7）将磁性颗粒用磁性架吸附后，收集磁性颗粒，重新悬浮于1ml 0.5×SSC中。

8）重复步骤7）两次。

9）将磁性颗粒用磁性架吸附后，收集磁性颗粒，尽可能将0.5×SSC溶液吸干。

10）将磁性颗粒悬浮于400μl无核酸酶的水中，磁性颗粒用磁性架吸附后，收集含有mRNA的上清。

11）可选：尽管少量磁珠并不影响以后的酶促反应，但为完全去除上清中残留的磁性颗粒，可将此液在4℃下12 000*g*离心1min，收集上清。

12）加入1/10体积的3mol/L乙酸钠（pH5.2）和1倍体积的异丙醇，－20℃沉淀过夜。

13）12 000*g*离心10min，收集mRNA沉淀。

14）加1ml预冷的70%乙醇洗涤沉淀（若保存时间多于1个月，应将mRNA沉淀保存于70%乙醇中）。

15）4℃下10 000*g*离心10min，收集mRNA沉淀。

16）空气中晾干或真空抽干沉淀。

17）将 mRNA 溶解于无 RNA 酶的水或 TE 中。

注意事项

1）开始试验之前要先把 GTC 抽提缓冲液、生物素化 Oligo（dT）探针（50pmol/μl）、无核酸酶的水和 0.5×SSC 温暖至室温；用 70℃水浴将稀释缓冲液加热到 70℃。

2）若保存时间多于 1 个月，应将 mRNA 沉淀保存于 70%乙醇中［步骤 14)］。

3）不要使 mRNA 沉淀过分干燥，否则很难溶解。

4. RT-PCR

材料与试剂

10 ×逆转录缓冲液（含有 25mmol/L $MgCl_2$)[(1×：10mmol/L Tris-HCl(pH 9.0，25℃)，50mmol/L KCl，0.1% Triton X-100，5mmol/L $MgCl_2$]

重组的 RNasin 核糖核酸酶抑制剂（40U/μl）

dNTP（各 10mmol/L）

AMV 逆转录酶

Oligo（dT)$_{15}$引物

随机引物

无核酸酶的水

Taq DNA 聚合酶

10×PCR 缓冲液

上、下游引物（10μmol/L）

TE

步骤

第一部分：逆转录反应

1）将 1μg poly（A)$^+$ mRNA 或总 RNA 加入微量离心管中并于 70℃ 温育 10min。短暂离心后置于冰上。

2）依照所列顺序加入以下试剂以建立一个 20μl 的反应体系（依据 RNA 的量，反应体积可以增减）。

组分	终浓度
10×逆转录缓冲液	1×
dNTP 混合物，10mmol/L	1mmol/L 每种 dNTP
重组的 RNasin 核糖核酸酶抑制剂	1U/μl
AMV 逆转录酶(高浓度)	15U/μg RNA
Oligo(dT)$_{15}$引物或随机引物	0.5μg /μg RNA
RNA	1μg
加无核酸酶的水至终体积为 20μl	

3）如果使用 Oligo（dT）$_{15}$引物：将反应体系于 42℃温育 15min；如果使用随机引物：将反应体系于室温温育 10min 以利于引物的伸展，然后于 42℃ 温育 15min。

4）将样品于 95℃加热 5min，然后于冰浴放置 5min，使 AMV 逆转录酶失活并阻止其与 DNA 结合。此方法合成的第一链 cDNA 可用于第二链 cDNA 的合成或琼脂糖凝胶分析。也可以将第一链 cDNA 存放于－20℃备用。

第二部分：PCR 反应

5）将 cDNA 稀释到 100μl 的 TE 或水中，用于 PCR 扩增。

6）将下列反应体系中的成分加入到反应管中。模板特异的上游或下游引物必须在此时加入。

组分	量	终浓度
第一链 cDNA 反应	10～20μl	10ng/μl
dNTP 混合物，10mmol/L	1.8μl	200μmol/L
10× PCR 缓冲液	9.8μl	1×
上游引物	50pmol	
下游引物	50pmol	
Taq DNA 聚合酶	2.5U	
加无核酸酶的水至终体积为	100μl	

7）根据自己的经验使用热循环仪。

8）用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

（二）致突变 PCR

在 PCR 产物中引入突变的渠道主要是通过引物引入错配碱基，或者是插入或缺失一个甚至多个碱基。这种突变是靶向的，突变发生在 DNA 模板上的位置可预先确定。目前主要采用这种定点突变的方法，即根据需要的不同，在引物的 5′端引入错配碱基。与传统的定点突变方法不同，PCR 介导产生突变体可以使用双链 DNA 分子作为模板，不必制备单链 DNA，因此实验程序更简单，所需时间也更短。通过 PCR 介导产生定点突变能够把一个自然条件下从未被发现的突变精确放置在靶基因的特定位置；能够把蛋白质的功能确定在特定的结构区域内；能够删除酶的非必需活性，提高所需活性并改变物理特性等。

1. 重叠延伸 PCR

在重叠延伸 PCR 中，分别从两个独立的 PCR 扩增反应得到两个重叠的 DNA 片段。目的突变位于重叠区域，存在于两个重叠的扩增片段中。需要设计 4 种引物：第一对引物扩增含有突变位点及其上游序列的 DNA 片段；第二对引物扩增含突变位点及其下游序列的 DNA 片段。两个侧翼引物含野生型序列，两个突变引物含有目的突变位点（置换、插入或缺失）。两次 PCR 的产物混合后，两个突变引物在重叠区之间退火，延伸成异源双链。此时加入外侧引物进行第 3 次 PCR，即可得到目的突变体（图 17-4）。这一

方法具有极高的致突变效率，但反应过程需要设计两条突变引物、两条侧翼序列引物和进行 3 次 PCR。在某些情况下，可在含有突变位点的扩增 DNA 片段末端引入限制酶位点，这样只设计一条突变引物和进行两次 PCR 即可完成反应。重叠延伸 PCR 构建突变体应用广泛、灵活，不受突变位置及突变类型的限制，可用于进行点突变、大片段插入及删除或两个及两个以上异源基因的剪接。用于剪接基因时，剪接引物也要存在末端互补，PCR 产生的 DNA 片段可以通过外侧引物延伸进行剪接和扩增，获得重组体（图 17-5）。

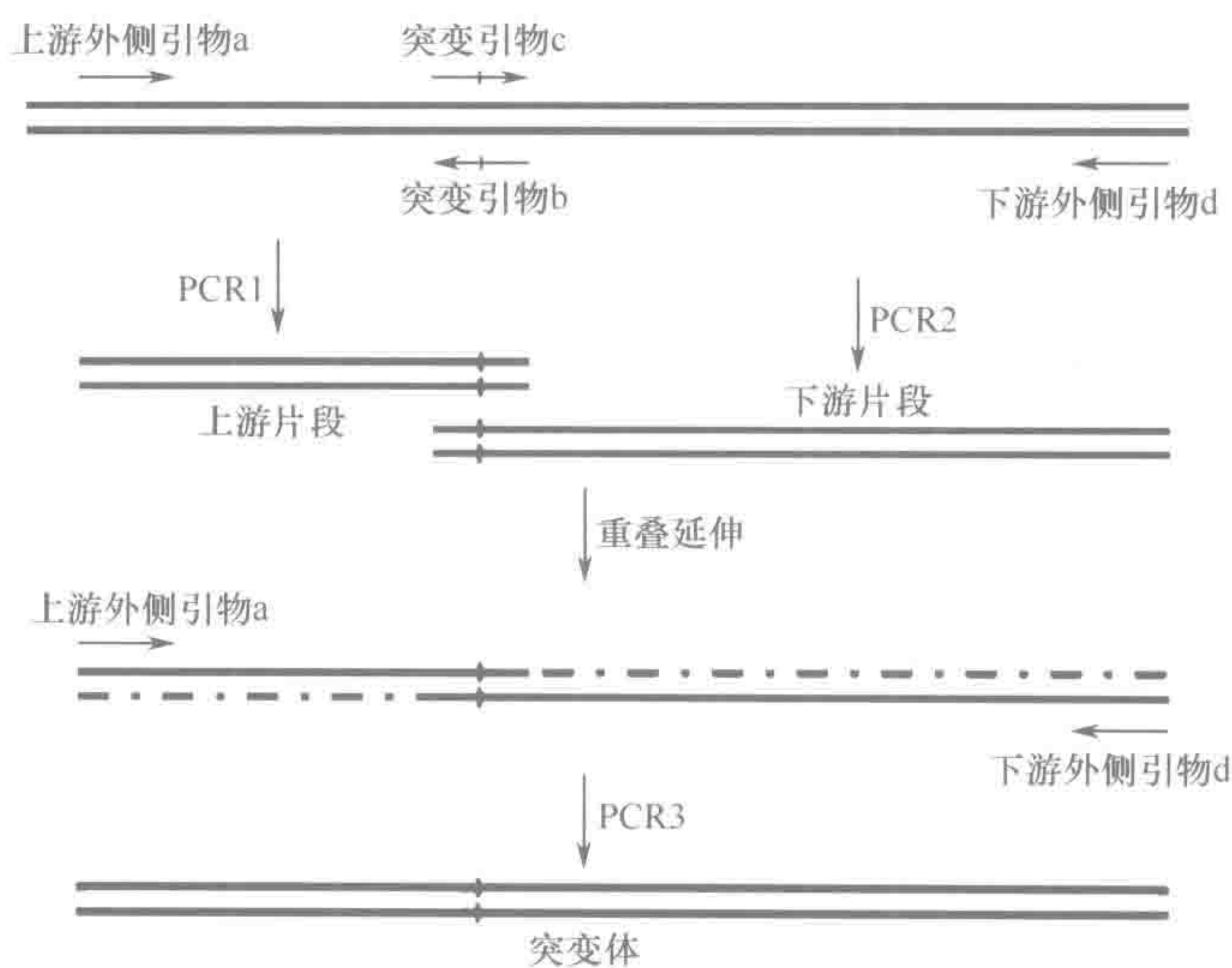


图 17-4　重叠延伸法进行定点突变

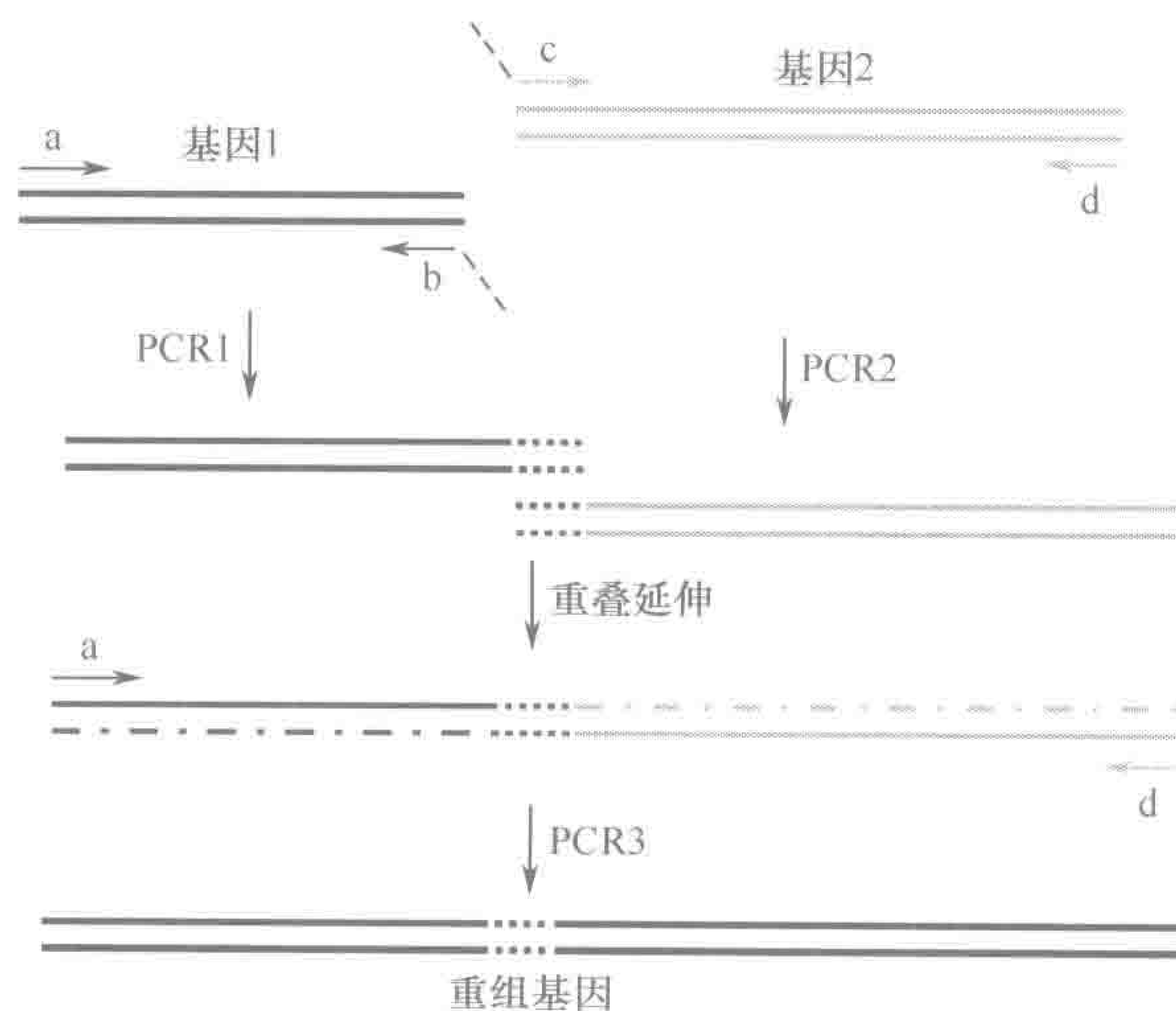


图 17-5　重叠延伸法剪接基因

材料与试剂

10×DNA聚合酶缓冲液
热稳定DNA聚合酶
25mmol/L $MgCl_2$
10mmol/L dNTP混合物
引物（10μmol/L）
无核酸酶的水
PCR设备
琼脂糖凝胶及电泳缓冲液

步骤

1）取两个管子，建立如下反应体系：

10×DNA聚合酶缓冲液	1×
25mmol/L $MgCl_2$	75nmol
10mmol/L dNTP	10nmol
模板DNA	100ng
引物（10μmol/L）	10pmol
引物（10μmol/L）	10pmol
热稳定DNA聚合酶	1U
ddH_2O	补充至总体积50μl

其中第1管含有上游外侧引物a和突变引物b；第2管含有突变引物c和下游外侧引物d。其他材料相同。如用于剪接基因，则两管分别采用不同的模板即可。

2）PCR扩增。94℃预变性5min；进行20～25个循环，每个循环94℃ 30s，50～60℃ 30s，72℃ 30s；最后72℃延伸10min。

3）琼脂糖凝胶电泳分析PCR反应产物。

4）纯化PCR产物。

5）取第3管建立以下反应体系：

10×DNA聚合酶缓冲液	1×
25mmol/L $MgCl_2$	75nmol
10mmol/L dNTP	10nmol
PCR反应1扩增产物	50ng
PCR反应2扩增产物	50ng
上游外侧引物a（10μmol/L）	10pmol
下游外侧引物d（10μmol/L）	10pmol
热稳定DNA聚合酶	1U
ddH_2O	补充至总体积50μl

6）PCR扩增。94℃预变性1min，50℃退火1min，72℃延伸5min；进行20～25个循环，每个循环94℃ 30s，50～60℃、30s，72℃、30s；最后72℃延

伸 10min。

7）利用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 反应产物。

8）PCR 产物纯化、克隆，筛选包含目的突变的重组子。

注意事项

1）热稳定 DNA 聚合酶。为了避免碱基的错误掺入，在重叠延伸突变反应中使用有 3′→5′ 外切核酸酶校对能力的热稳定 DNA 聚合酶是关键。另外，使用的 DNA 聚合酶一定不能具有催化非模板性掺入腺苷酸残基的能力（如 *Taq* DNA 聚合酶可以在 PCR 产物末端引入一个 A）。合适的 DNA 聚合酶包括 Pwo DNA 聚合酶（Boehringer Mannheim）、rTth DNA 聚合酶 XL（应用生物系统公司）、VentR DNA 聚合酶（New England Biolabs）、Pfu DNA 聚合酶（Stratagene）和 Pyrobest DNA 聚合酶（Takara）等。

2）突变引物。设计突变引物应遵循一些基本原则。与模板链互补；有足够的与靶序列结合的长度；携带的错配碱基应位于中央位置；含有与模板完全杂交的 5′ 端区；能形成足够稳定的杂交分子；无回文、重复或自身互补序列。突变引物或剪接引物上都包含两部分：引发部分和重叠部分。引发部分在寡聚体的 3′ 端，起引物作用，重叠部分在寡聚体 5′端，在重叠延伸反应中退火。设计合理的 DNA 引物对于快速高效完成基于 PCR 的突变实验是非常重要的。突变寡核苷酸的长度以 16～25 个碱基为宜，所设计的突变位点应位于引物的中央部分，引发部分带有 12 个正确配对的碱基，突变位点的 5′端一侧带有 6 个正确配对的碱基，这样两条突变引物之间的重叠部分至少有 13 个碱基，完全可以保证 PCR 1 和 PCR 2 产物的良好退火。

3）模板浓度。从理论上讲，加大模板量，在低循环次数即可获得足够产物，因此可减少 PCR 引起的碱基错误掺入。但高浓度的模板可能妨碍 PCR 顺利扩增，同时可能会扩增出过多的长度超过目的产物的单链产物，导致本底增加。因此，确定合适的模板浓度也很重要。一般来说，50～500ng 的克隆模板或者 1～2μg 的基因组 DNA 都可以得到没有显著扩增本底的目的产物。

2. 大引物 PCR

大引物 PCR 方法需进行两轮 PCR，需要两个外侧引物，但只需要设计一个带有目的突变的内部突变引物，是目前以 PCR 为基础的突变方法中最为简单和经济的。外侧引物与目的基因或临近载体序列互补，内部突变引物可朝向两个外侧引物中较近的一个，以便将大引物的长度保持最短。第一轮 PCR 以野生型 DNA 为模板，在内部突变引物和较近的一个外侧引物之间进行。产物经纯化后作为第二轮 PCR 的引物（双链大引物），与另一个外侧引物一起以野生型 DNA 为模板进行，这样产物即包含目的突变，大小为两个外侧引物间的距离（图 17-6）。

材料与试剂

10×DNA 聚合酶缓冲液

热稳定 DNA 聚合酶

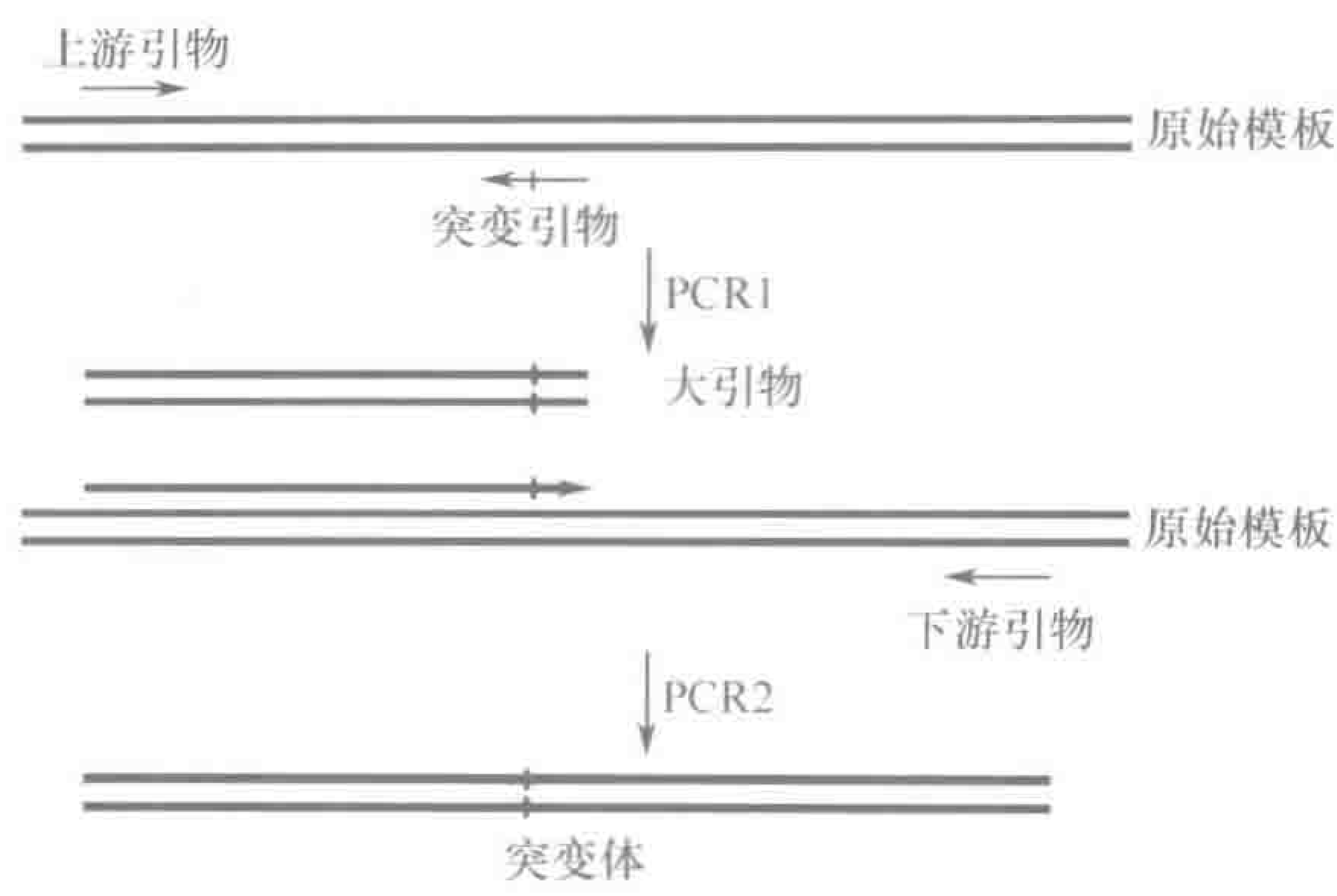


图 17-6 大引物 PCR 法进行定点突变

25mmol/L $MgCl_2$
10mmol/L dNTP 混合物
引物（10μmol/L）
无核酸酶的水
琼脂糖凝胶及电泳缓冲液

步骤

1）取1个管子，建立如下反应体系：

10×DNA 聚合酶缓冲液	1×
25mmol/L $MgCl_2$	75nmol
10mmol/L dNTP	10nmol
模板 DNA	100ng
上游外侧引物 a（10μmol/L）	10pmol
内部突变引物（10μmol/L）	10pmol
热稳定 DNA 聚合酶	1U
ddH_2O	补充至总体积 50μl

2）PCR 扩增。94℃预变性 5min；进行 20～25 个循环，每个循环 94℃ 30s，50～60℃ 30s，72℃ 30s；最后 72℃延伸 10min。
3）琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 反应产物。
4）纯化 PCR 产物。
5）取第2管建立以下反应体系：

10×DNA 聚合酶缓冲液	1×
25mmol/L $MgCl_2$	75nmol
10mmol/L dNTP	10nmol
模板 DNA	100ng
第一轮 PCR 反应扩增产物（大引物）	10pmol
下游外侧引物 d（10μmol/L）	10pmol

热稳定 DNA 聚合酶　1U
ddH_2O　补充至总体积 50μl

6）PCR 扩增。94℃预变性 1min；进行 20～25 个循环，每循环 94℃ 30s，50～60℃ 30s，72℃ 30s；最后 72℃延伸 10min（可根据不同引物序列和扩增长度调节退火温度和延伸时间）。
7）琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 反应产物。
8）PCR 产物纯化、克隆、筛选包含预期突变的重组子。

注意事项

1）引物的设计与浓度。突变引物长度为 16～25 个碱基，应具有低 T_m 值。所设计的突变位点应位于引物的中央部分，两侧带有 8～10 个正确配对的碱基。首轮 PCR 产物（大引物）应与终产物的长度相差较大，否则不易于分离。大引物的长度一般在 100～500bp 时终产物的量较高。第一轮 PCR 中，外侧引物与突变引物的退火温度应较低；而另一条与大引物配对的外侧引物则需设计成具有较高的退火温度，退火可以防止大引物在第二轮 PCR 中继续合成。此外，外侧引物的浓度要比突变引物的浓度高。
2）模板的浓度。在第二轮 PCR 反应中加入较高浓度的模板有利于提高最终产物的量。如果产量过低，可用两条外侧引物对突变产物进行再次扩增。
3）大引物的纯化。如突变在两个管内进行，可在第一轮 PCR 反应结束后，对合成的大引物进行纯化，以提高第二轮 PCR 终产物的产量。而在单个反应管进行时，则建议在第一轮结束后取少量 PCR 产物进行电泳验证，证实大引物合成成功后再进行第二轮 PCR。

3. 快速 PCR 定点突变

快速 PCR 定点突变采用质粒作为模板，在突变位点附近设计两条分别与质粒的正负链互补的引物，其中一条引物上含有突变碱基。扩增出含有突变的两条线性 DNA 后，PCR 反应管中还存在亲代模板 DNA 以及杂合 DNA。因为质粒通常是从 *E. coli* 中纯化而来的，*E. coli* 中存在的 Dam 甲基化酶通常将质粒 DNA 中的碱基 G 甲基化为 G^{m6}，因此可以用能识别并切断甲基化和半甲基化 DNA 的限制酶（如 D*pn* Ⅰ限制酶，靶序列为 5′-G^{m6}ATC-3′）来消化反应混合物中的含有甲基化位点的 DNA（亲代和杂交 DNA 模板），而经 PCR 扩增出而不存在甲基化位点的突变体 DNA 得以保留。然后利用 T4 多核苷酸激酶将已掺入所需突变的用于重新环化的线性化载体 DNA 的 5′端加磷酸，以利于连接，再用 DNA 连接酶重新连接起来，并转化到 *E. coli* 中（图17-7）。快速 PCR 定点突变直接以环状质粒 DNA 为模板，只需一套引物，操作简便，产生突变体只需几小时，而效率可达 50%以上。

材料与试剂

10×DNA 聚合酶缓冲液
热稳定性 DNA 聚合酶
25mmol/L $MgCl_2$

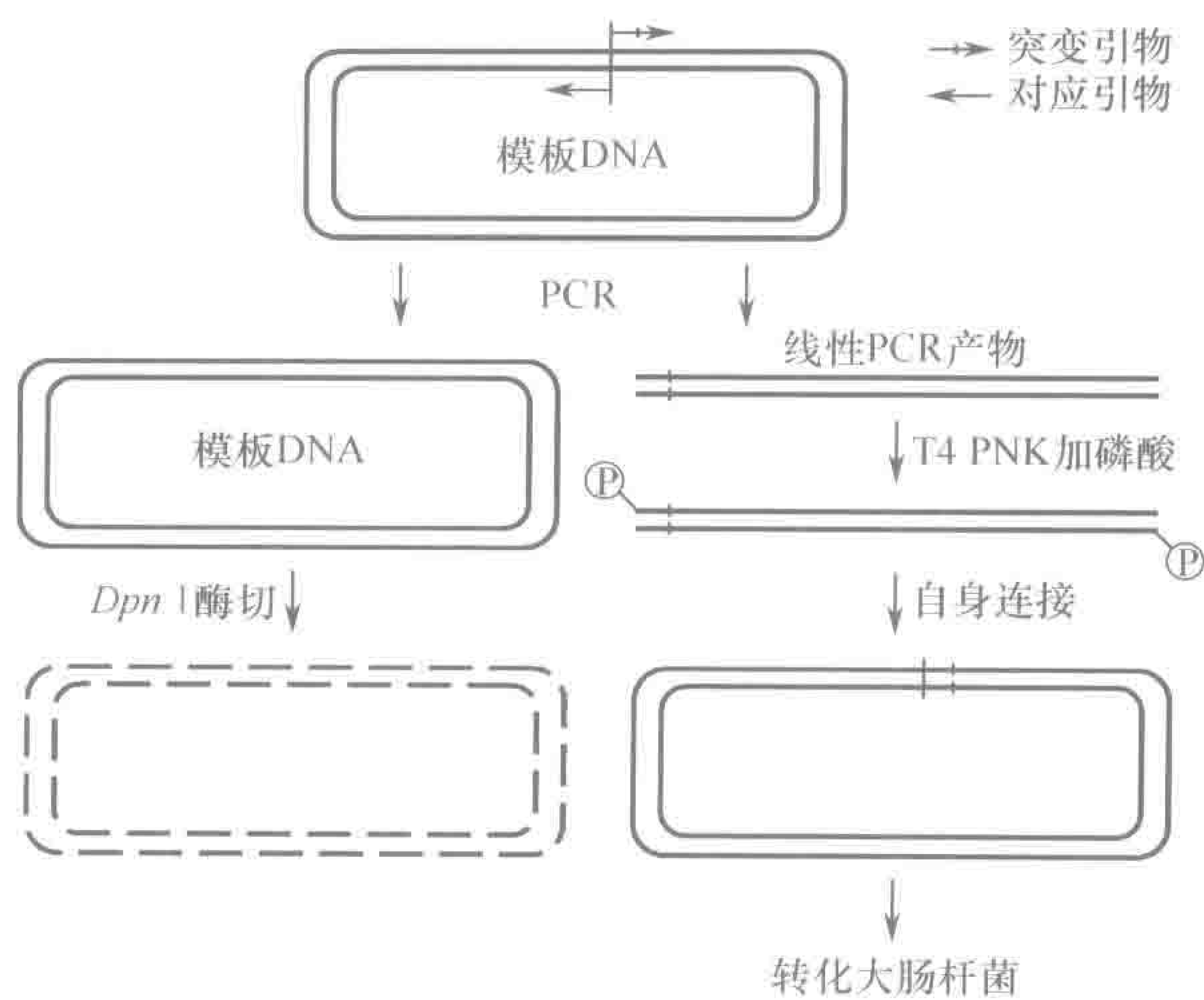


图 17-7　快速定点突变法进行定点突变

10mmol/L dNTP 混合物

引物（10μmol/L）

无核酸酶的水

琼脂糖凝胶及电泳缓冲液

Dpn Ⅰ限制性内切核酸酶（简称限制酶）(10U/μl)

T4 多核苷酸激酶（10U/μl）及其缓冲液

ATP 10mmol/L

T4 DNA 连接酶及其缓冲液

步骤

1）取 1 个管子，建立如下反应体系：

10×DNA 聚合酶缓冲液	1×
25mmol/L $MgCl_2$	75nmol
10mmol/L dNTP	20nmol
模板 DNA	0.5pmol
突变引物 a（10μmol/L）	15pmol
突变引物 b（10μmol/L）	15pmol
热稳定性 DNA 聚合酶	2U
ddH_2O	补充至总体积 50μl

2）PCR 扩增。94℃预变性 5min；进行 20 个循环，每个循环 94℃ 30s，56℃ 30s，72℃ 2min；最后 72℃延伸 10min；4℃孵育 10min。

3）PCR 反应结束后，加入 *Dpn* Ⅰ限制酶 1μl，37℃孵育 10min。

4）72℃孵育 10min，以终止反应。

5）琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 反应产物，产物应呈一条单一条带。

6）从琼脂糖凝胶中回收目的 DNA 片段。

7）取第 2 管建立以下磷酸化反应体系：

10×T4 多核苷酸激酶缓冲液	1×
ATP	1mmol/L
纯化的 DNA 片段	约 1pmol
ddH_2O	补充至总体积 20μl

70℃孵育 5min，然后冰上冷却；再加入 T4 多核苷酸激酶 1μl，37℃孵育 30min；随后 70℃孵育 5min 使酶变性。

8）可选：磷酸化产物纯化。

9）取第 3 管建立以下连接反应体系：

10×T4 连接酶缓冲液	1×
磷酸化反应产物	约 0.25pmol
T4 连接酶	10U
ddH_2O	补充至总体积 10μl

10）产物连接、转化并筛选重组子，提取质粒进行酶切或测序鉴定。

注意事项

1）当模板质粒来自于少数 Dam 缺陷的 *E. coli* 或来自其他宿主的未甲基化 DNA 时，可用 Dam-甲基化酶先将模板进行体外甲基化。

2）使用的 DNA 聚合酶一定不能具有催化非模板性掺入腺苷酸残基的能力（例如，*Taq* DNA 聚合酶可以在 PCR 产物末端引入一个 A）。合适的 DNA 聚合酶包括 *Pfu* DNA 聚合酶（Stratagene）和 Pyrobest DNA 聚合酶（Takara）等。

3）引物设计的优化 快速 PCR 定点突变的引物设计很关键，设计中应注意以下几点：①突变引物和第 2 个引物双方必须能与质粒的不同链退火；②引物间的距离要求不严格，但引物间不能相互重叠；③引物的长度一般应在 20 个碱基以上，但更短的引物也可以；④错配碱基应位于引物的 5′端，引物 3′端至少要有 15 个碱基以上的可以正确配对的序列；⑤引物应能合成 PCR 产物；⑥如果省略加磷酸步骤，则引物中至少应有一条是 5′磷酸化的。

4）PCR 反应条件的优化在进行 PCR-SDM 前，最好能对 PCR 条件进行优化，以便合成出全长 PCR 产物。在优化变性、退火和延伸时间时，这些试剂的浓度仍要保持一致。在 PCR-SDM 方法中，所使用的主要扩增参数能保证产生全长线性模板分子。条件建立后，再适当增加模板浓度减少循环次数，同时将其他有关操作注意事项考虑进去。

第二节　定量 PCR 技术的基本原理

定量 PCR（quantitive polymerase chain reaction）技术的概念是指以外参或内参为标准，通过对 PCR 终产物的分析或 PCR 过程的监测，进行 PCR 起始模板量的定量。定量 PCR 技术在定量过程中需借助参照物进行特定模板在样品中的含量分析，参照物

按其性质不同可分为内参照和外参照，二者均是在定量PCR过程中一种已知含量的标准品。内参照是指与待检样本一起加于同一扩增系统的参照物，如果参照物与待检样本共用同一对引物，两模板的扩增存在竞争性，这种条件下进行的PCR又称竞争性PCR。相对于内参照，外参照是指使用独立于待检样本定量PCR的扩增系统，通过外参照单独扩增，建立标准品初始含量与最终产物之间的标准曲线，用于未知样本的类推定量（非竞争性PCR）。目前的定量分析多采用非竞争性定量RT-PCR。

一、传统的终点定量PCR方法

（一）非竞争性定量PCR的原理

在基因定量分析中，必须考虑两个影响定量结果的重要因素，一是不同样本的逆转录和PCR扩增效率不同；二是PCR反应的平台效应，只有在PCR平台期之前扩增，所得终产物才与加入的RNA模板数量呈线性关系。因此只有严格控制条件、设置参照物才可以进行准确定量。

非竞争RT-PCR一般选用在细胞中有相对稳定表达量的看家基因，如以肌动蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）、微管蛋白等作为内源性参照物，有时也用18S rRNA。这些内参照物自然存在于样品RNA中，无须额外加入。利用内源参照物可以分析样品中RNA的完整性和降解情况，以及逆转录和PCR反应的效率，因此，可校正因RNA的完整性及反应效率的差异对RT-PCR终产物量的影响，同时也可校正由模板定量误差、加样误差以及各孔间的温度差等所造成的误差。定量分析时，将同一样品RT-PCR反应中目的基因的产物量对内参照基因产物量的比值，作为分析不同样品间目的基因表达差异的定量标准，因而，它是一种半定量的方法。

但是，内源性参照物用于基因表达的定量分析也有其局限性，主要表现在：内源性mRNA与目的mRNA的含量相差太大，导致两者扩增动力学不一致；二者mRNA的序列长短和二级结构存在差异，造成逆转录效率不一致；两者的扩增引物不同，导致扩增效率差别；内源性mRNA在组织细胞中的表达量并不总是恒定的。上述几个原因将会极大地影响PCR产物量，由此影响对目的mRNA的精确定量。

（二）非竞争性定量PCR的步骤

内参照基因常用GAPDH和β-肌动蛋白（β-actin）。引物序列如下。

GAPDH：上游：5′-ACCACAGTCCATGCCATCA-3′；

下游：5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′。

β-actin：上游：5′-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3′；

下游：5′-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3′。

操作时取两个0.2ml的PCR管，分别用于目的基因和内参照基因的扩增。每一个PCR管中除PCR引物外，其他成分完全相同（内参照基因扩增管中加入内参照基因引物，目的基因扩增管中加入目的基因引物）。在适当的温度参数下扩增

28～32 个循环，反应结束后，对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，采用凝胶图像分析系统，对目的基因和内参照基因产物电泳条带进行密度扫描，据此对目的基因表达进行定量分析。

（三）终点定量的局限性

理论上 PCR 是一个指数增长的过程，但是实际的 PCR 扩增曲线并不是标准的指数曲线，而是 S 形曲线。这是因为随着 PCR 循环的增多，扩增规模迅速增大，*Taq* 酶、dNTP、引物，甚至 DNA 模板等各种 PCR 要素逐渐不敷需求，PCR 的效率越来越低，产物增长的速度就逐渐减缓。当所有的 *Taq* 酶都被饱和以后，PCR 就进入了平台期。由于各种环境因素复杂的相互作用，不同的 PCR 反应体系进入平台期的时机和平台期的高低难以精确控制。所以，即使是重复实验，各种条件基本一致，最后得到的 DNA 拷贝数也是完全不一样的，波动很大（图 17-8）。

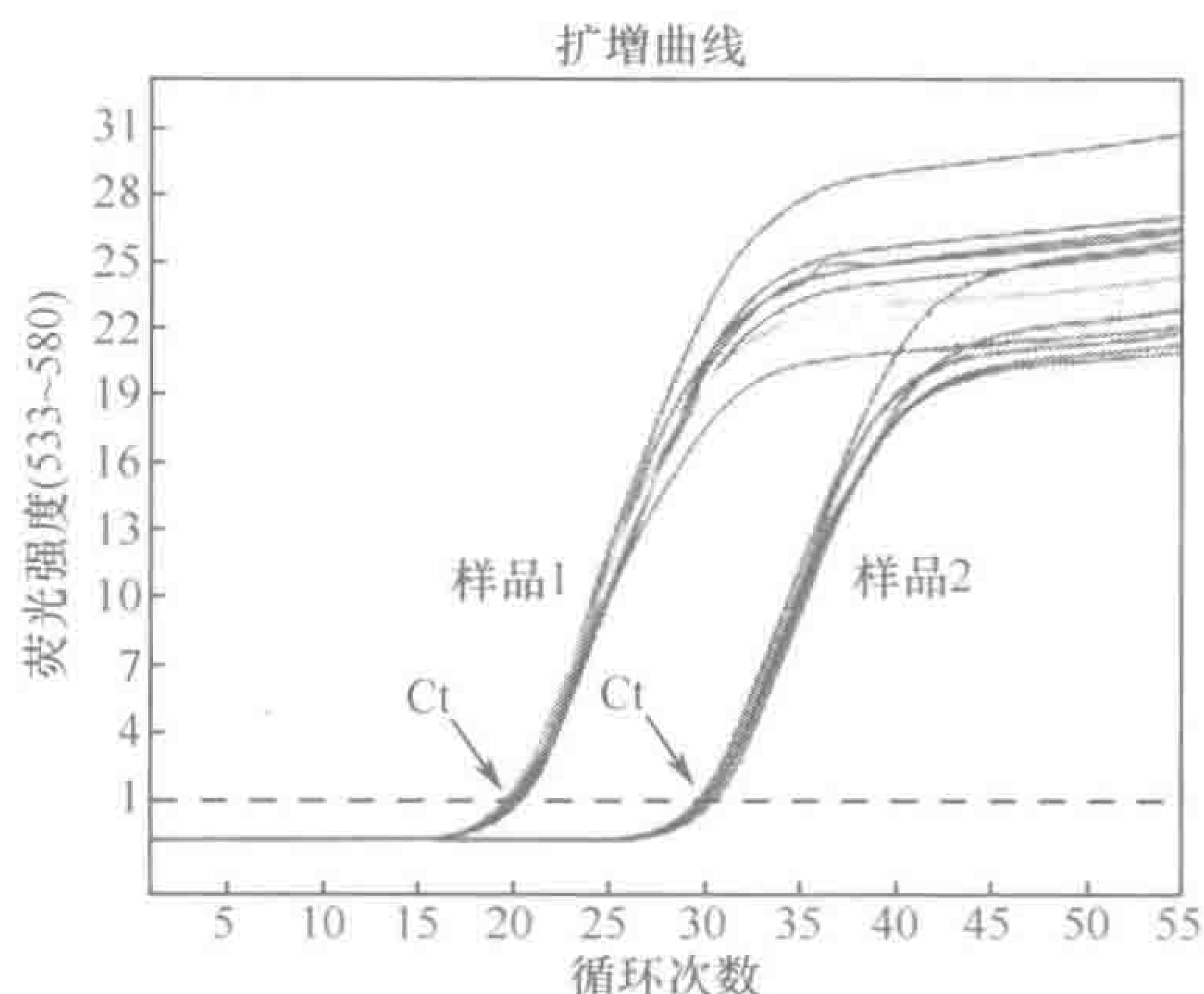


图 17-8　相同模板在同一台 PCR 仪（Roche 公司的 LightCycler 480）上进行 10 次扩增的扩增曲线图

传统的定量方法，如溴化乙锭染色掺入标记后的光密度扫描等，测定的都是 PCR 的终产物，而不是起始 DNA 拷贝数。由于 PCR 的终产物量与起始模板量之间没有线性关系，所以经过 PCR 扩增以后的 DNA 拷贝数已经不能反映 PCR 放大之前标本中的 DNA 原始拷贝数。在这种情况下，就不能采用终点定量，而要根据 Ct 值（cycle threshold）确定 DNA 起始期数量（见下文），在这种需求下荧光定量 PCR 技术应运而生。

二、实时定量 PCR 方法

（一）原理

实时荧光定量 PCR（real-time fluorescent quantitative PCR，q-PCR）技术是在 PCR 反应中引入一种荧光化学物质，随着 PCR 反应的进行，荧光信号强度会随着 PCR 反应产物不断累积而等比例增加。每经过一个循环，收集一个荧光强度信号，这样我们

就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化，从而得到一条荧光扩增曲线图，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析（图 17-9）。

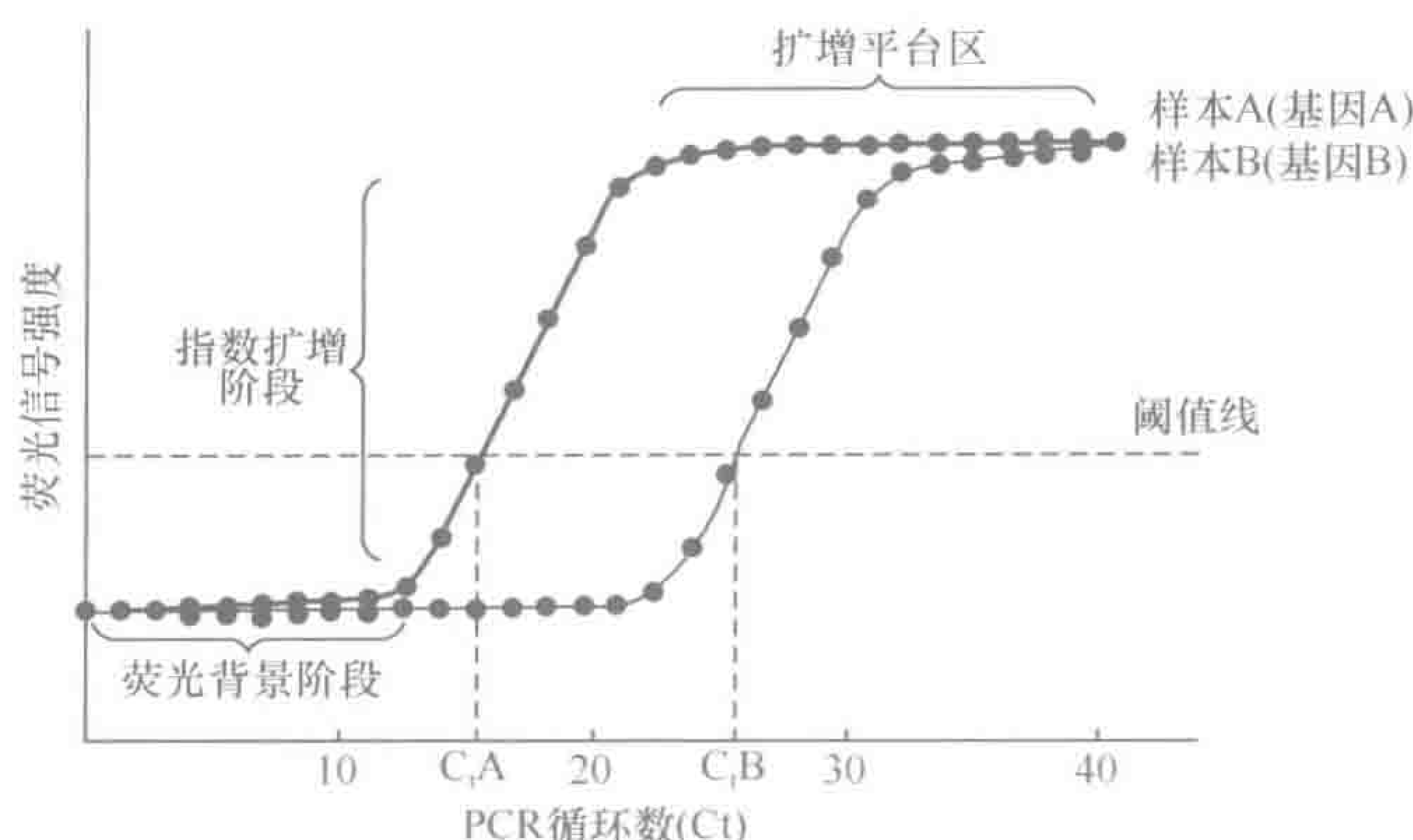


图 17-9　实时荧光定量 PCR 扩增曲线

R 报告荧光；NFQ：无荧光淬灭基团；MGB：小沟结合物

为了便于对所检测样本进行比较，在 q-PCR 反应的指数期，首先需人为设定一个荧光信号的域值，一般这个荧光域值的默认设置是 3～15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。如果检测到的荧光信号达到域值被认为是真正的信号，它可用于定义样本的阈值循环数（Ct 值），即每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系。起始拷贝数越多，Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可做出标准曲线（图 17-10），因此，只要获得未知样品的 Ct 值，即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

q-PCR 技术是 PCR 从定性到定量的飞跃，优点是特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等。q-PCR 不需 PCR 后处理，避免了交叉污染。再配以分析软件，整个 PCR 过程实现了自动化。与传统的定量方法相比劳动强度小，易于标准化和推广应用。

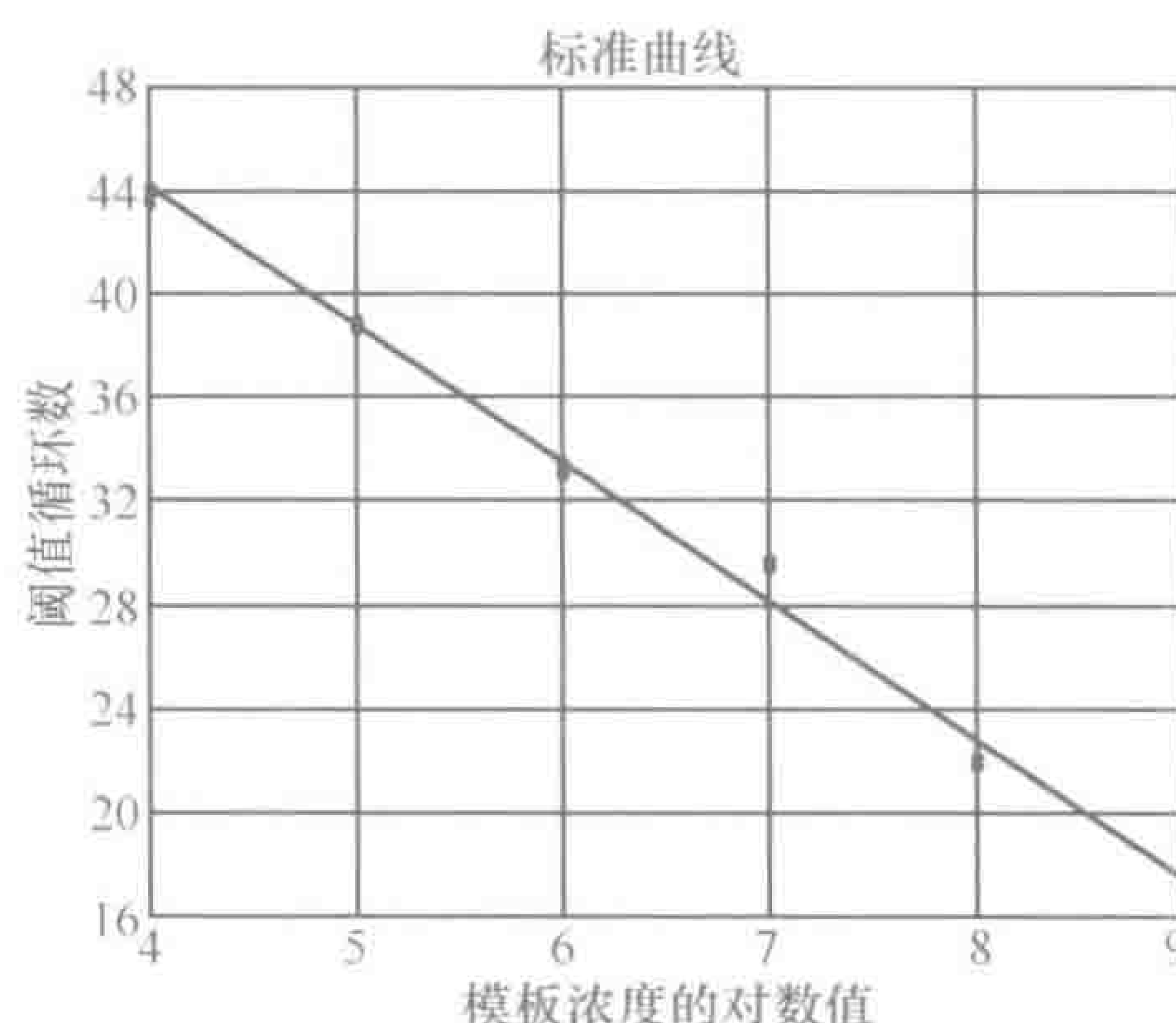


图 17-10　实时定量 PCR 标准曲线

（二）荧光探针和荧光染料

实时荧光定量 PCR 按化学原理分为探针类和非探针类两种，探针类是利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加，由于增加了探针的识别步骤，特异性更高；非探针类则是利用荧光染料或者特殊设计的引物来指示扩增的增加，优点是简便易行。

1. TaqMan 探针

TaqMan 探针法利用 *Taq* 酶的 3′→5′外切核酸酶活性切断探针，产生荧光信号。这

是一种高度特异的技术，由于探针与模板特异性结合，所以荧光信号的强弱就代表了模板的数量。

TaqMan 探针法需要设计一对 PCR 引物和一条探针。探针的 5′端标记有报告基团（reporter，R），如 FAM、VIC 等，3′端标记有荧光淬灭基团（quencher，Q），如 TAMRA 等。探针的结合位点在两条引物之间。当探针完整的时候，淬灭基团吸收了报告基团所发射的荧光能量，仪器不能检测到荧光信号。当 *Taq* 酶在链延伸过程中遇到与模板结合的探针时，其 3′→5′外切核酸酶活性就会将探针切断，报告基团与淬灭基团远离，报告基团的能量不能被吸收，即产生荧光信号（图 17-11）。所以荧光信号也和目的片段一样，每经过一个 PCR 循环即有一个同步指数增长的过程。信号的强度就反映了模板 DNA 的拷贝数。

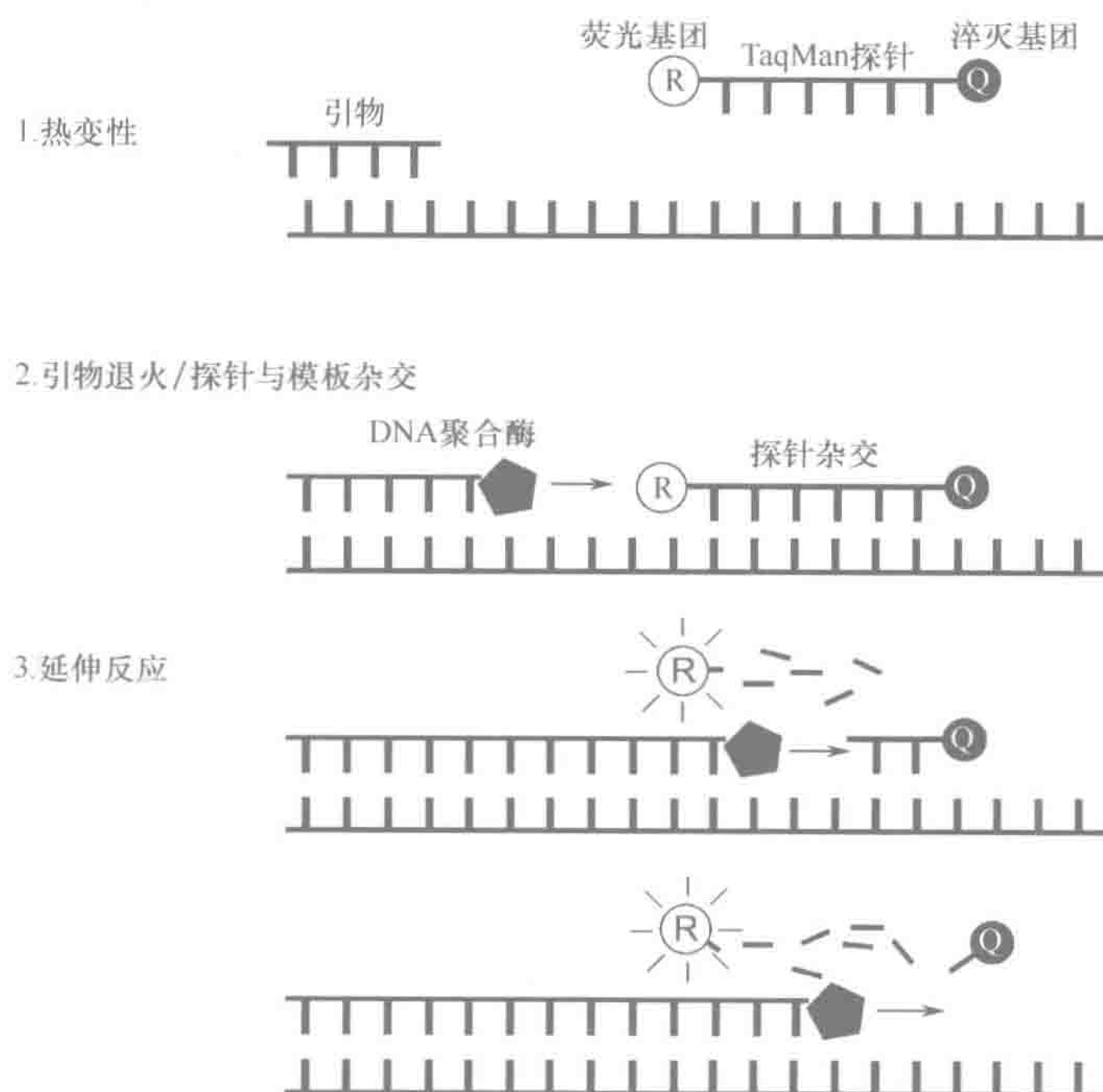


图 17-11　TaqMan 探针的荧光信号产生机制

为了提高信号强度并降低背景，目前又发展出一种 MGB 探针（图 17-12）。探针上还连接有 MGB（minor groove binder）修饰基团，可以将探针的 T_m 值提高 10℃左右；同时采用无荧光淬灭基团（non-fluorescent quencher，NFQ），即本身不产生荧光，这样就大大降低了本底信号的强度。在同样的 T_m 值情况下，MGB 探针可以比普通 TaqMan 探针设计得更短。因为在模板 DNA 碱基组成不理想的情况下，短的探针比长的更容易设计，因此设计 MGB 探针会大大提高设计探针的成功率。研究表明，对于富含 A/T 的模板，使用 TaqMan MGB 探针更为理想。

2. SYBR Green I 荧光染料

SYBR Green I 是只与双链 DNA 结合的荧光染料。与双链 DNA 结合后，其荧光大

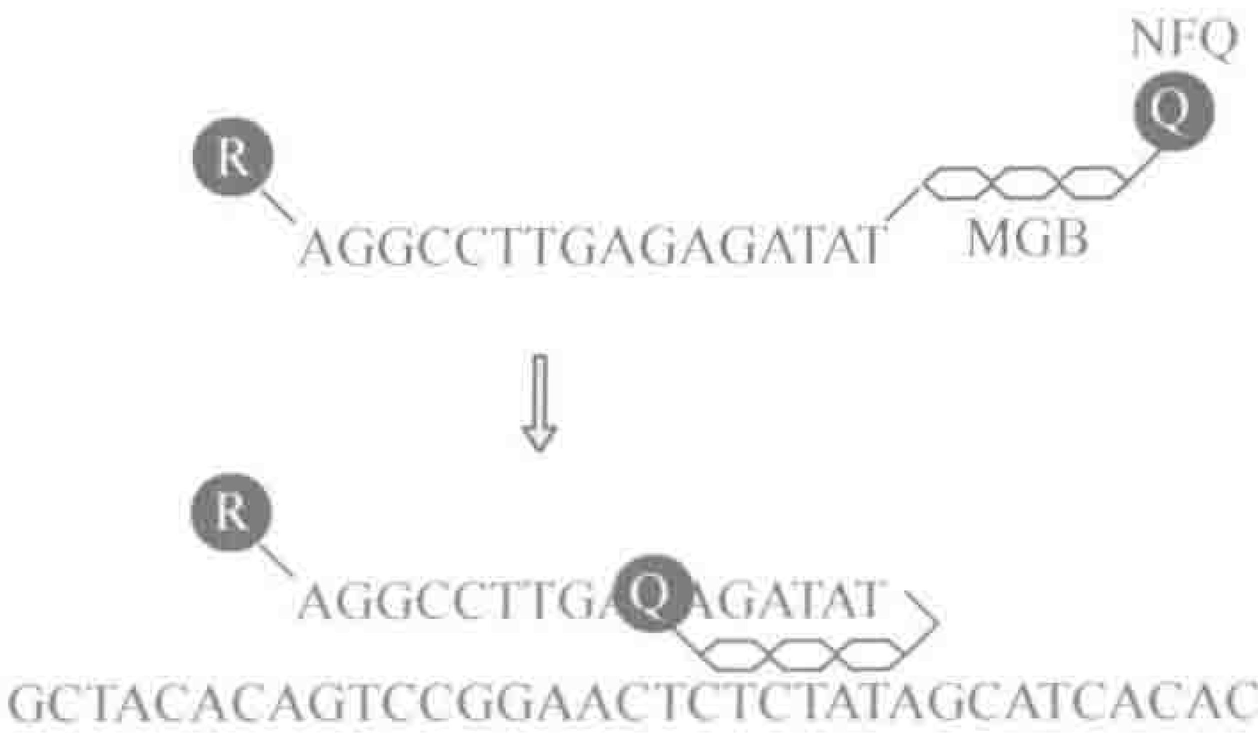


图 17-12　TaqMan MGB 探针工作原理

R：报告荧光；NFQ：无荧光淬灭基团；MGB：小沟结合物

大增强。这一性质使其用于扩增产物的检测非常理想。SYBR Green Ⅰ的最大吸收波长约为 497nm，发射波长最大约为 520nm。在 PCR 反应体系中，加入过量 SYBR 荧光染料，SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后，发射荧光信号，而不掺入链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号，从而保证了荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。SYBR Green 荧光染料法定量 PCR 的基本过程是：①开始反应，当 SYBR Green 染料与 DNA 双链结合时发出荧光；②DNA 变性时，SYBR Green 染料释放出来，荧光急剧减少；③在聚合延伸过程中，引物退火并形成 PCR 产物；④ 聚合完成后，SYBR Green 染料与双链产物结合，定量 PCR 系统检测到荧光的净增量加大（图 17-13）。

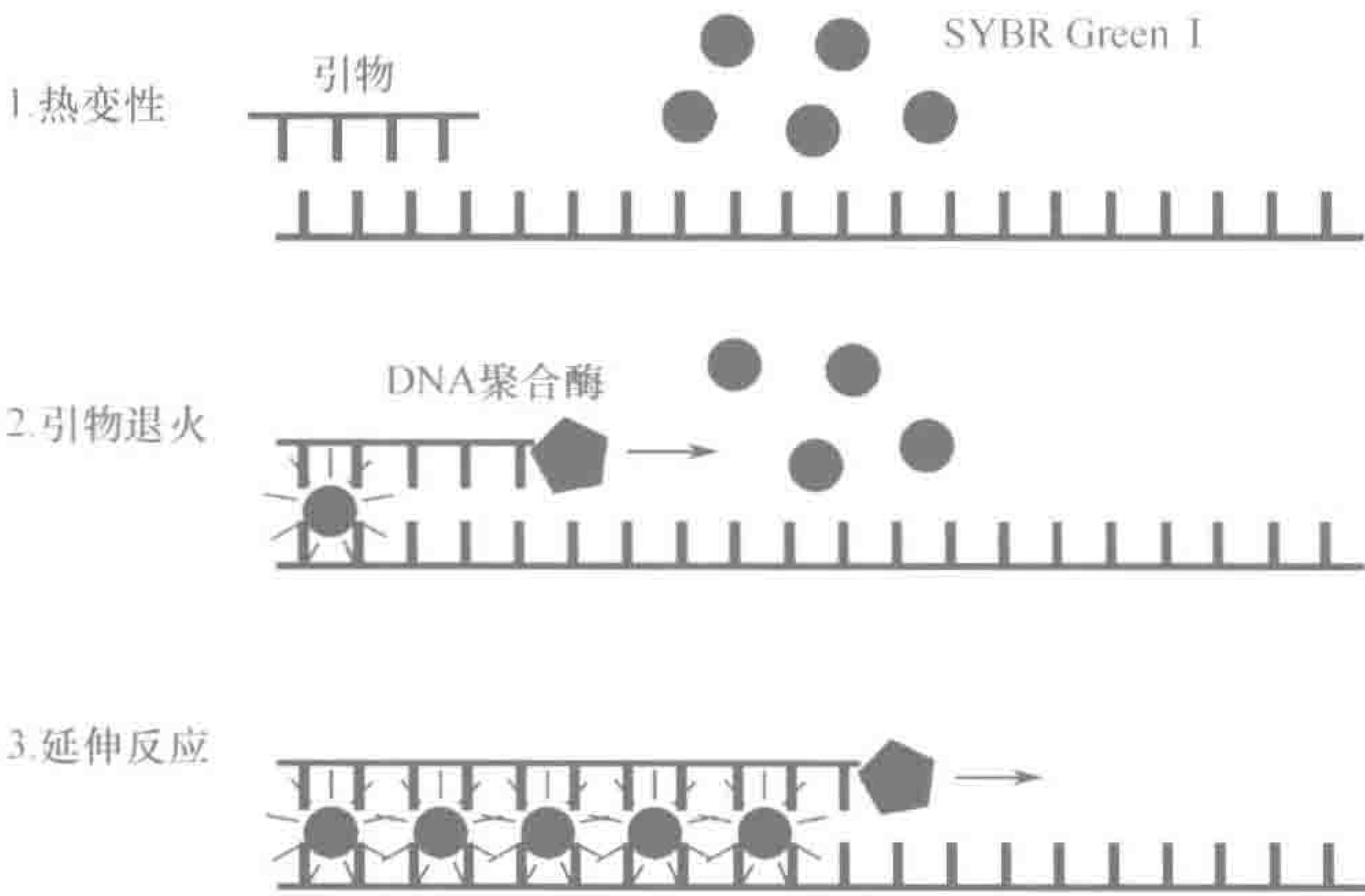


图 17-13　SYBR Green Ⅰ工作原理

SYBR Green Ⅰ在核酸的实时检测方面有很多优点，由于它与所有的双链 DNA 相结合，不必因为模板不同而特别定制，因此设计的程序通用性好，且价格相对较低。利用荧光染料可以指示双链 DNA 熔点的性质，通过熔点曲线分析可以识别扩增产物和引物二聚体，因而可以区分非特异扩增，进一步地还可以实现单色多重测定。此外，由于一个 PCR 产物可以与多分子的染料结合，因此 SYBR Green Ⅰ的灵敏度很高。但是，正是由于 SYBR Green Ⅰ对 DNA 模板没有选择性，因此由引物二聚体、单链二级结构

以及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性，所以其特异性不如 TaqMan 探针。要想用 SYBR Green I 荧光染料法得到比较好的定量结果，对 PCR 引物设计的特异性和 PCR 反应的质量要求就比较高。在此前提下，本法是一种成本低廉的选择。通过测量升高温度后荧光的变化可以帮助降低非特异产物的影响。由解链曲线来分析产物的均一性有助于分析由 SYBR Green I 得到的定量结果。

3. 分子信标

分子信标（molecular beacon）是一种在靶 DNA 不存在时形成茎环结构的双标记寡核苷酸探针。在此发夹结构中，位于分子一端的荧光基团与分子另一端的淬灭基团紧紧靠近。在此结构中，荧光基团被激发后不是产生光子，而是将能量传递给淬灭剂，这一过程称为荧光谐振能量传递（FRET）。由于“黑色”淬灭剂的存在，由荧光基团产生的能量以红外而不是可见光形式释放出来。如果第二个荧光基团是淬灭剂，其释放能量的波长与荧光基团的性质有关。分子信标的茎环结构中，环一般为 15～30 个核苷酸长，并与目标序列互补；茎一般为 5～7 个核苷酸长，并相互配对形成茎的结构。荧光基团连接在茎臂的一端，而淬灭剂则连接于另一端。分子信标必须非常仔细地设计，以达到在复性温度下，模板不存在时形成茎环结构，模板存在时则与模板配对。与模板配对后，分子信标的构象改变使荧光基团与淬灭剂分开。当荧光基团被激发时，它发出自身波长的光子（图 17-14）。

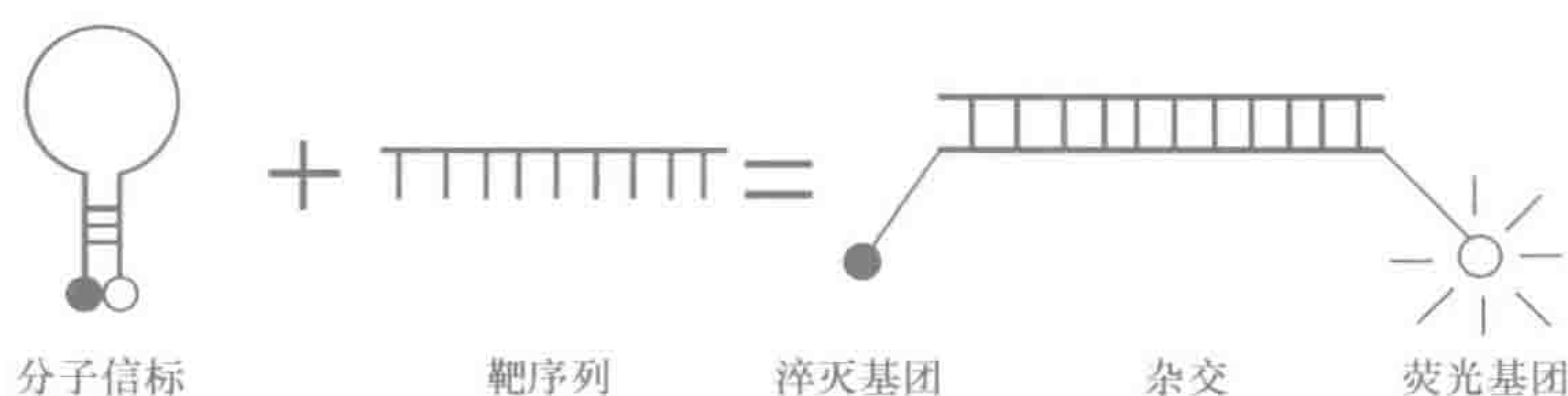


图 17-14　分子信标工作原理

4. LUX 引物

LUX（light upon extention）引物是利用荧光标记的引物实现定量的一项新技术。目标特异的引物对中的一个引物 3′端用荧光报告基团标记。在没有单链模板的情况下，该引物自身配对，形成发夹结构，使荧光淬灭。在没有目标片段的时候，引物与模板配对，发夹结构打开，产生特异的荧光信号。

与 TaqMan 探针和分子信标相比，LUX 引物通过二级结构实现淬灭，不需要荧光淬灭基团，也不需要设计特异的探针序列。因为 LUX 引物是一个相对较新的技术，所以其应用还有待实践的检验。

（三）数据处理与分析

目前，用实时定量 PCR 进行定量分析可分为绝对定量和相对定量。绝对定量法通过标准曲线计算起始模板的拷贝数；相对定量法则是比较不同样品目标基因转录样本之间的相对表达差异。

1. 绝对定量

绝对定量（标准曲线定量）法需要制备一系列拷贝数已知的浓度梯度标准品，通过 q-PCR 做出标准品拷贝数梯度与 Ct 值之间的标准曲线；待测样品 Ct 值带入标准曲线即可得到待测样品中目的基因的拷贝数。该方法主要用于临床医疗领域基因诊断和病原体的检测，包括特定基因的检测、寄生虫、病毒、细菌、支原体和衣原体等病原体的检测。绝对定量能够获得基因表达的准确量，但针对不同的目的基因，需要构建不同的标准品，这就增加了实验的难度和复杂性。

标准曲线定量一般采用以下步骤。

1）制备标准品。将已知基因 DNA 片段克隆在载体上，就能准确地知道克隆载体 DNA 的碱基数，对克隆载体 DNA 进行定量，这样就能用下列公式计算出提取的克隆载体 DNA 的拷贝数：拷贝数＝[DNA 质量(g)/DNA 摩尔质量]$\times 6.02\times 10^{23}$。

也可以用更简单的公式来计算：拷贝数＝$(9.1\times 10^{11})\times$1mg/1kb DNA。

对质粒 DNA 溶液分别以 5 倍或 10 倍进行倍比稀释后作为 q-PCR 的模板。

2）利用与检测未知样品相同的 PCR 体系进行 q-PCR 扩增，测定 Ct 值，以模板 DNA 拷贝数的对数值和 Ct 制作标准曲线，计算出曲线斜率（图 17-15）。根据产生的斜率（S）确定 PCR 效率

$$\text{PCR 效率}=10^{(-1/S)}-1$$

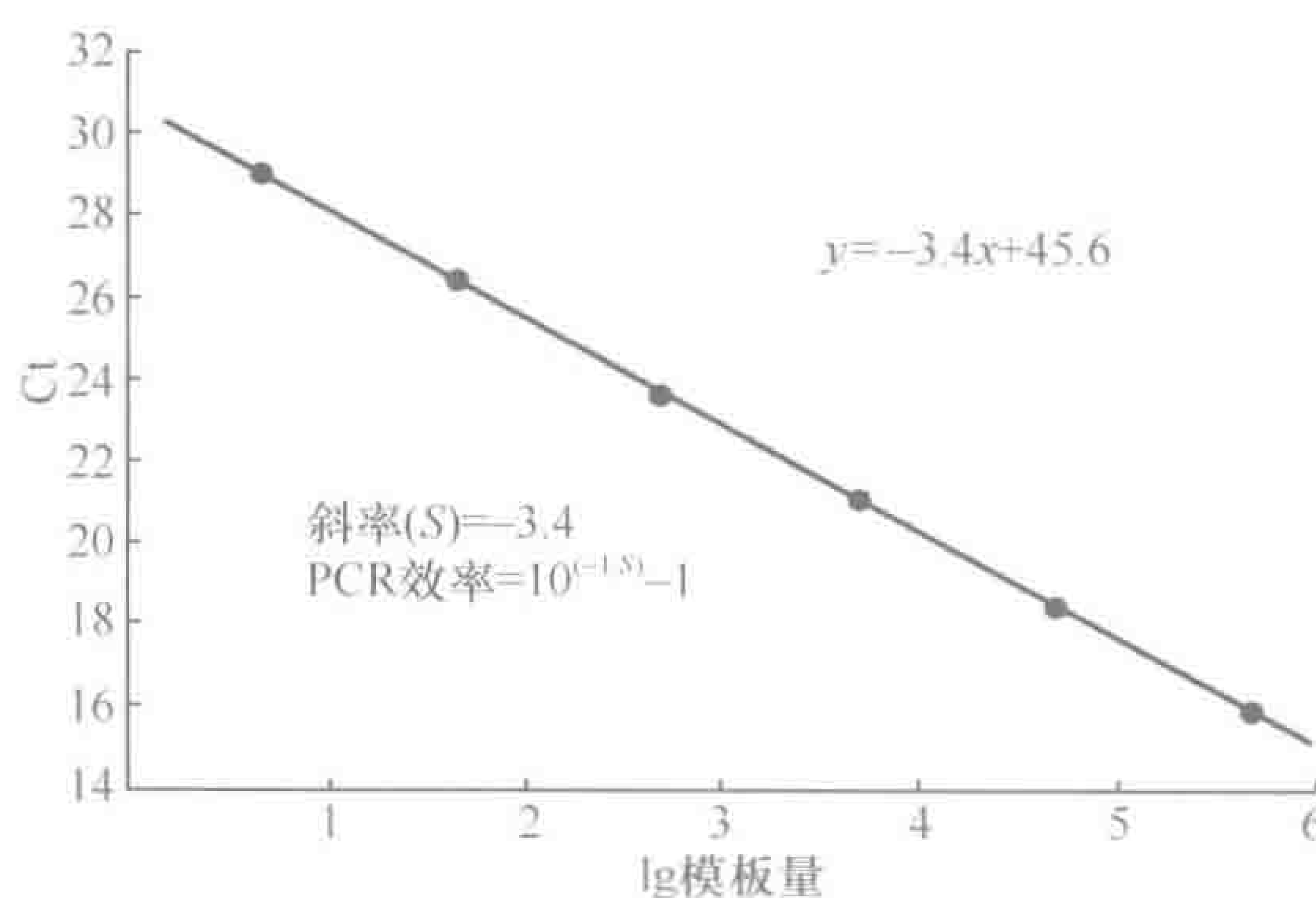


图 17-15 计算 PCR 效率和模板量化的假设标准曲线示意图

在图 17-15 中，$S=-3.32$ 对应 PCR 效率为 100%，在这个例子里，$S=-3.4$，对应 PCR 效率为 97%。

3）对未知样品进行 q-PCR 扩增，所得到的 Ct 值与标准曲线比对，即可得出未知样品的浓度/拷贝数。当测定某种样品中的病毒颗粒数目或拷贝数少的基因时，标准曲线定量方法非常有效。对照基因不是绝对必要，但精细定量未知基因时，上样对于获得正确结果至关重要；加一个对照基因可能有助于判定上样是否存在明显错误。理想的标准曲线应包括未知基因量的上下限（图 17-15）。

2. 相对定量

相对定量法用样本中目的基因拷贝数相对于另一对照基因拷贝数的比例，作为比较不同样品间目的基因表达差异的标准。相对定量不需要确切地了解目的基因的实际拷贝数，而只需要得到目的基因拷贝数相对于对照基因拷贝数的变化即可。

利用 q-PCR 比较多个样本之间的差异时，采用相对定量分析是最合适的方法。通过从目的基因的 Ct 值减去对照基因的 Ct 值，即同一样品中目的基因与对照基因 Ct 值的差异（ΔCt），即可获得目的基因相对于对照基因的定量。循环数差别是基数 2 的指数，表示这两个基因的模板倍数差别。而互相比较的两个样品中目的基因的表达差异为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$。

这种方法的前提是目的基因和对照基因的 PCR 效率接近，并近似为 1（一般应不小于 90%）。可以通过对各自的模板浓度作梯度稀释并各自进行扩增后分析扩增产物 ΔCt 的变化，来判断两个 PCR 扩增是否具有相同效率。通过模板浓度梯度的自然对数值对 ΔCt 作图，如果所得直线斜率的绝对值接近 0，说明目的基因和对照基因的扩增效率相同。否则必须重新设计引物、优化反应条件，以使二者具有相同的扩增效率。

（四）引物设计

对于实时 PCR 测定实验的引物，现在有专业软件帮助设计。表 17-2 列出了一些提供引物设计软件的网址。Primer3（美国 MIT 的 Whitehead 生物医学研究所产品）是一个免费引物设计软件，能用于设计产生理想实时 q-PCR 实验结果的引物，包括设计能整合到内部的杂交探针。无论用什么软件程序，引物和探针的设计都必须十分谨慎。如果用 SYBR Green I 方法，PCR 引物不能形成引物二聚体。如果用杂交探针，探针序列最好位于外显子/外显子交界处，引物设计成跨过内含子，其 3′端 5～6 个碱基与相邻外显子互补，以防引物在基因组 DNA 模板上产生配对，降低了污染基因 DNA 时产生 PCR 产物的概率。与此类似，分子信标或带双标记的探针设计也应跨过内含子与两个相邻外显子匹配，这样就排除了杂交探针非特异性配对产生信号的可能性。此外，还应当用扩增序列搜索基因组序列以确保 PCR 反应不会扩增到假基因。PCR 扩增的产物长度应足够小，用于杂交的探针一般为 70～150bp，SYBR Green I 方法的扩增产物不要超过 300bp。

表 17-2　用于引物合成设计的有关网址

提供的组织机构	网　址
Applied Biosystems	http://www.appliedbiosystems.com
Biosearch Technologies	http://www.biosearchtech.com
Cephied	http://www.cepheid.com
Integrated DNA technologies	http://www.idtdna.com
Invitrogen	http://www.invitrogen.corn/lux
Lark Technologies	http://www.lark.com
MIT	http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/
Molecular Probes	http://www.probes.com

续表

提供的组织机构	网　　址
Operon	http://www.operon.com
Q-PCR Listserve	http://groups.yahoo.tom
Q-PCR.tom	http://www.q-pcr.com
Roche	http://www.roche.com
Santa Lucia Lab	http://jsl.chem.wayne.edu/hyther
Stratagene	http://www.stratagene.com

第三节　实时荧光定量 PCR 的实验操作与优化

一、基本实验步骤

以 mRNA 模板为例，实时 q-PCR 试验一般包含如下步骤（图 17-16）。

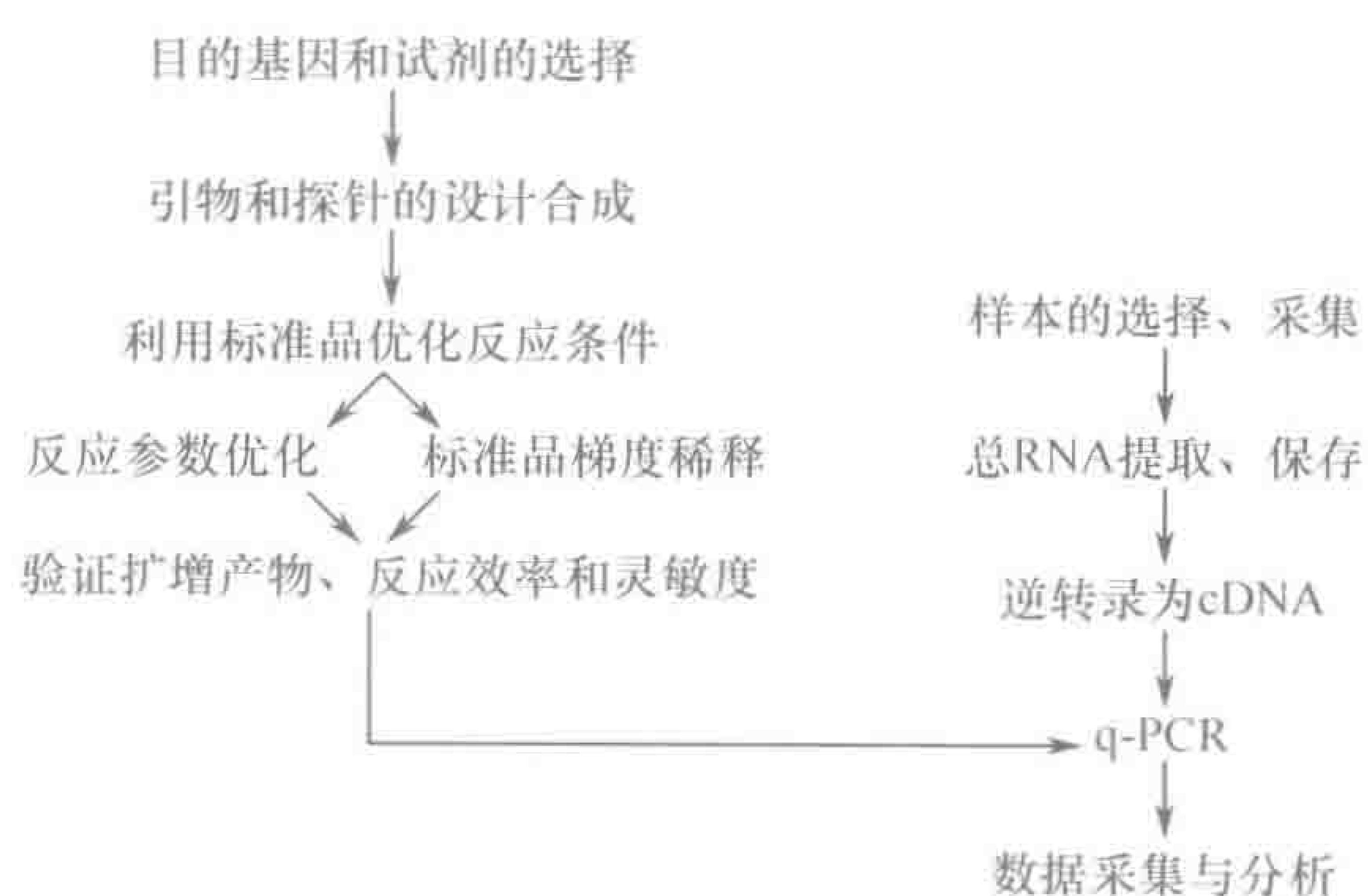


图 17-16　实时 q-PCR 实验流程

1）设计实验方案。如模板的选择、样品的分离纯化、实验组和对照组的设置。

2）引物和探针的选择、设计与合成。

3）抽提总 RNA，测定浓度。

4）逆转录为 cDNA。

5）定量 PCR。

6）数据分析。

（一）TaqMan 探针

各实验室、不同实验、不同用途其方法都存在差别，这里介绍利用 TaqMan 探针的方法检测血液中病毒拷贝数。下列体系为 TaqMan 探针的一般反应体系和在 ABI 7700 荧光定量 PCR 仪的操作方法。

材料与试剂

标记探针

TaqMan 通用 PCR 母液
引物
模板：从外周血白细胞中提取的基因组 DNA
无核酸酶的水

步骤

第一部分：标准曲线的制作

1）用 PCR 方法扩增相应的 DNA 片段。
2）克隆到一通用载体上，如 pMD18-T 载体。
3）提取含插入片段的质粒，进行测序鉴定无误后，以此质粒作为标准品。
4）用分光光度计测定质粒 DNA 量，利用第三节的公式计算其拷贝数。
5）用无核酸酶的水对质粒 DNA 进行 10 倍系列稀释，选择浓度范围为 $10^2 \sim 10^8$ 拷贝/μl，用作制作标准曲线的模板。
6）在一个无核酸酶的 PCR 反应管中配制如下反应体系：

TaqMan 通用 PCR 母液	25μl
上游引物（终浓度 200nmol/L）	1μl
下游引物（终浓度 200nmol/L）	1μl
标记探针（终浓度 100nmol/L）	1μl
DNA 模板	1μl
无核酸酶的水	21μl

7）在 ABl 7700 荧光定量 PCR 仪上行如下 PCR 条件：95℃ 10min；45 次循环 95℃ 15s，55℃ 30s，72℃ 30s；在每一退火/延伸步骤收集荧光资料。
8）利用仪器附带的软件 Sequence Detector Ver. 1.7 进行结果分析，自动得出 Ct 值。
9）以系列稀释液中 DNA 拷贝数的对数作为横坐标，以 Ct 值为纵坐标制图和确定斜率的函数公式。

第二部分：待测样品的 q-PCR

10）在一个无核酸酶的 PCR 反应管中配制如下反应体系：

TaqMan 通用 PCR 母液	25μl
上游引物（终浓度 200nmol/L）	1μl
下游引物（终浓度 200nmol/L）	1μl
标记探针（终浓度 100nmol/L）	1μl
DNA 模板（终浓度 0.1～2μg）	1μl
无核酸酶的水	21μl

11）在 ABl 7700 荧光定量 PCR 仪上行如下 PCR 条件：95℃ 10min；45 次循环，95℃ 15s，55℃ 30s，72℃ 30s；在每一退火/延伸步骤收集荧光资料。
12）利用仪器附带的软件 Sequence Detector Ver. 1.7 进行结果分析，仪器能够根

据标准曲线自动计算出拷贝数。

注意事项

1）TaqMan 探针法中探针和引物均选择高度保守区段序列，可采用 PRIMEREX-PRESS 软件（Version 1.5，应用生物系统公司，Foster City，CA）和其他公司提供的软件设计。为了减少 PCR 扩增中产生非特异产物，可将 PCR 引物在 GenBank 里进行对比，理想的 PCR 引物不与其他基因存在同源序列。

2）为了避免标记的荧光探针衰减，应保持高浓度（100pmol/μl）储存于－20℃，到临用前再进行稀释。

（二）SYBR Green I 染料

这里介绍利用 SYBR Green I 染料的方法使用 LightCycler 1.5（Roche）仪器检测小鼠细胞中白细胞介素 10（IL-10）的相对表达。

材料与试剂

2×SYBR Green 实时 PCR 反应母液（TOYOBO 公司，含 *Taq* 酶、dNTP、PCR 缓冲液、SYBR Green I、BSA 和抗 *Taq* DNA 聚合酶单抗）

引物（10μmol/L）：小鼠 IL-10。上游引物：5′- GCTCTTACTGACTGGCAT-GAG-3′；下游引物：5′- CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3′

小鼠 β-actin。上游引物：5′-AGTGTGACGTTGACATCCGT-3′；下游引物：5′-GCAGCTCAGTAACAGTCCGC-3′

无核酸酶的水

步骤

1）模板制备——逆转录 cDNA：从组织细胞中提取总 RNA（见前述），取 2μg 总 RNA 逆转录为 cDNA，溶于 160μl TE，作为 PCR 模板。

2）在一个无核酸酶的 PCR 反应管中配制如下反应体系，总体积 20μl：

SYBR Green 实时 PCR 反应母液	10μl
上游引物（终浓度 200nmol/L）	0.4μl
下游引物（终浓度 200nmol/L）	0.4μl
cDNA 模板	4μl
无核酸酶的水	5.2μl

3）在 LightCycler 1.5 荧光定量 PCR 仪上行如下 PCR 条件：变性 95℃ 30s；循环 40 次，95℃ 5s，56℃ 10s，72℃ 15s；荧光信号测定：延伸期结束 78℃ 1s；在 PCR 扩增结束后，设定 65～95℃进行熔解曲线分析（20℃/s）。

4）利用仪器附带的定量程序软件 Version 3.5 进行结果分析。

（三）LUX 引物方法

这里介绍用 LUX 引物在 ABI 7700 仪器上进行 c-myc 基因标准曲线的方法。

材料与试剂

白金定量 PCR SuperMix-UDG（Invitrogen 公司）

白金 *Taq* DNA 聚合酶（Invitrogen 公司）

c-myc 特异性 LUX 引物

未标记的引物：5′-GACGCGGGGAGGCTATTCTG-3′

FAM 标记的 LUX 引物：5′-GACTCGTAGAAATACGGCTGCACCGAGTC -FAM -3′

牛血清白蛋白

模板 DNA

无核酸酶的水

步骤

1）用 PCR 方法扩增相应的 DNA 片段。

2）克隆到一通用载体上，如 pGEM-T 载体。

3）提取含插入片段的质粒，进行序列分析。

4）测定质粒 DNA 量，计算其拷贝数。

5）先把质粒从 $10 \sim 10^7$ 拷贝的范围内进行系列稀释，稀释后的质粒 DNA 溶液用作制作标准曲线的模板。

6）在一个无核酸酶的 PCR 反应管中配制如下反应体系：10μl SuperMix-UDG、1μl 10μmol/L FAM 标记的 LUX 引物（终浓度为 500nmol/L）、1μl 10μmol/L 未标记引物（终浓度为 500nmol/L）、1μl 5mg/ml 牛血清白蛋白（终浓度为 250ng/μl）、0.6U 白金 *Taq* DNA 聚合酶（使反应体系中总含量为 1.2U）、2μl 模板 DNA，加水至 20μl。

7）在 ABI 7700 荧光定量 PCR 仪上行如下 PCR 条件：50℃ 2min（消化 UDG）；95℃ 5min（模板变性；使尿嘧啶 DNA 糖基化酶失活；使热启动 *Taq* 聚合酶活化）；循环 45 次，95℃ 15s，55℃ 30s，72℃ 30s；熔解曲线分析：40℃ 1min，95℃ 19min，25℃ 2min。

8）利用仪器附带的软件 Sequence Detector Ver. 1.7 进行结果分析，以系列稀释液中模板 DNA 起始拷贝数的对数作为横坐标，以 Ct 值为纵坐标绘制标准曲线。

注意事项

LUX 引物设计软件（LUX Dsigner）默认参数已经设定为扩增 75～200bp 长度的片段，引物退火温度为 60～68℃。该软件设置的参数可以使形成引物自身互补或引物间二聚体的可能降到最低。设计的引物可以横跨外显子之间的边缘区域或结合区域。

二、实验的优化

（一）重复试验、标准曲线和阳性、阴性对照

为误差降低到最小，需要设立重复实验，并对数据进行统计处理。一般定量实验的每个样本至少要重复 3 次以上，严格的定量更需重复 6～8 次，以满足小样本统计的

要求。

如果做绝对定量（见本章第二节相关内容），则标准曲线需要在 5 个点以上。标准曲线使用的标准品是浓度已知的 DNA 样本，可以自己制备，也可以购买商品化的试剂盒。其 PCR 反应条件应当与未知样本的一致，以便在同一反应板上同时定量。

阴性对照中以水或缓冲液代替模板 DNA，用于检验是否存在 PCR 污染。阳性对照则用于检验 PCR 试剂和实验操作上可能出现的问题。如果实验中设立了内参照，则既可以用来校正数据，也可以起到阳性对照的作用。

（二）污染预防

为保证定量的准确性，要预防非特异性 PCR 扩增和污染。常用的措施有使用 UNG 酶（uracil-*N*-glycosylase）和热启动。UNG 酶的作用原理是降解含有 dU 的双链或单链 DNA。它在 50℃激活，95℃灭活。由于商用 PCR 试剂盒均以 dUTP 取代 dTTP，所以 PCR 产物都是含有 dU 的 DNA 链。在定量 PCR 开始前增加 50℃的保温步骤，UNG 酶即可将已有的 PCR 产物降解破坏，防止可能造成的污染。

普通的 *Taq* 酶即使在室温下也有一定的活性，因此在加入 PCR 试剂的过程中、正式 PCR 开始前就会完成少量 PCR 扩增，增加了背景，影响定量精度。目前研发的金牌 *Taq* 酶是经过特殊修饰的，常温下其活性部位被封闭，没有活性；只有经过 95℃ 10min 的热启动以后，封闭被解除，才能开始 DNA 链延伸，这样就最大限度地减少了杂信号的生成。

（三）误差分析

由于 PCR 反应的灵敏性，反应体系的微小变化能在很大程度上影响反应进程，因此，对于同一个待测样本，在做 q-PCR 时有必要设立 3 个（或以上）复孔，Ct 值由 3 个复孔的平均值和标准差组成，所得的 Ct 值是一个变化区间。在做 ΔCt 的计算时，如果目的基因和对照基因分别在不同的反应管中进行，则应先计算重复孔的平均 Ct 值，然后再计算 ΔCt，ΔCt 的标准差由目的基因和对照基因复孔的标准差做合并标准差处理后得到；如果目的基因和对照基因在同一个反应管中进行扩增，则先计算每一个管中的 ΔCt，再用 3 个复孔的 ΔCt 取平均值和标准差。如果 3 个复孔的 Ct 值变化过大，则需重新进行反应。对照样本的 ΔCt 应看成常数，而只计算处理组的标准差。

第四节　定量 PCR 仪及其发展

一、q-PCR 仪的分类

荧光定量 PCR 都需要特殊的仪器，目前市面上有多家品牌，比较知名的如美国应用生物系统公司（Applied Biosystems，ABI）、罗氏（Roche）、伯乐（Bio-Rad）、Corbett 和 Eppendorf，其中 Applied Biosystems 和 Roche 开发较早，技术比较成熟，价格也较昂贵，其他一些品牌也各有一些技术性的革新。因为荧光定量的运行完全采用试剂

盒，成本相对比较昂贵，因此在选择仪器时，除了考虑仪器的性能和价格以外，还必须考虑仪器的适用范围、运行成本以及相关的配套分析软件等。目前在国内使用得比较多的荧光实时定量 PCR 仪有 ABI 的 7500 型、7900 型、7700 型和罗氏公司的 LightCycler 等。

按照仪器的加热性能可分为以下两类。

（一）半导体加热

半导体加热是使用最普遍的一种，具有导热好、易自动化、速度快、直接加热和降温效果好的优点，但其使用的是金属介质，很难做到与反应管的无缝接触，由此影响加热块与反应管温度的一致性。ABI、Bio-Rad 等公司生产的仪器都属于这一种。

ABI 目前主要销售 Prism 7500、7900 HT、StepOne 和 StepOne Plus 等几种种实时荧光定量 PCR 仪。其中 Prism 7500 为五色荧光，能够有效地分辨包括 FAM、SYBR Green I、VIC/JOE、Cy3、ROX/Texas Red 和 Cy5 在内的多种荧光染料。实时荧光定量 PCR 仪器系统的全部 96 个样品孔采用同一卤钨灯作为光源，可发出全光谱的光源，易更换，但是寿命短。7900 HT 系统是为支持高通量分析而研制的。在 2007 年 1 月 ABI 公司推出了第四代实时 PCR 扩增仪——StepOne 和 StepOnePlus 系统。StepOne 系统为三色（SYBR Green/FAM，VIC/JOE 和 ROX）48 孔的系统，而 StepOnePlus 系统为四色（SYBR Green/FAM，VIC/JOE，NED/TAMRA 和 ROX）96 孔系统。这几种仪器均可进行基因表达分析、病原体绝对定量分析、SNP 基因型分析以及以阳性内对照为基础的阳性/阴性结果判定等。

Bio-Rad（伯乐）公司的 CFX96 实时定量 PCR 仪是以其 C1000 PCR 仪为基础，增加易于安装、可更换的实时定量反应模块而生成。CFX96 为五色荧光，能够有效地分辨包括 FAM/SYBR、HEX/TET/VIC、Texas Red/ROX、Cy5 和 Quasar 705 在内的多种荧光染料。可进行梯度 PCR，便于快速优化实验条件。支持 SYBR Green 或 FAM 快速扫描模式，50min 内即可完成 PCR 反应。

Roche 公司 2006 年推出的 LightCycler480 也属半导体加热式，是一款针对高通量实验需要而设计开发的 96/384 互换式实时荧光定量系统，采用 Therma-Base 模块加热技术和独特的快速散热装置，确保孔间温度的均一性，同时匹配以先进光学检测系统，确保信号的整体采集和检测灵敏度最大化，消除了传统模块加热式系统中的“边缘效应”。它具有 5 个激发通道和 6 个检测通道，能够有效地分辨 FAM/SYBR、VIC/JOE、NED/TAMAR/CY3、Texas Red/ROX 和 Cy5 等多种荧光染料。

（二）空气加热

用空气做热传导介质的优点是可与反应体系无缝接触，同时无需金属的精密加工，降低了仪器成本。但是如果单靠外埠空气制冷，则受环境温度影响大。空气的导热性差、比热小的弱点也很明显，为此需要利用离心来产生空气流动，增强导热性，同时使用毛细管，加大接触面积、试剂微量化来弥补。

Roche 公司的 LightCycler1.5/2.0 采用通过交替注入加热的空气以及环境温度的空

气进行温度循环，转变速度可高达 20℃/s，30min 内即可完成 40 个循环。LightCycler1.5具有 530nm、640nm 和 710nm 3 个荧光检测通道，适用 SYBR Green I、水解探针、杂交探针和单探针等检测模式。升级版 LightCycler2.0 具有 6 个检验通道，提供 530nm、560nm、610nm、640nm、670nm 和 710nm 的荧光检测。独特的离心、空气加热和毛细反应管等设计，使其成为很有特色的 PCR 仪。离心可使加热空气流动而增强导热性，毛细反应管设计则加大与热空气接触面积，试剂微量化弥补空气导热的不足。PCR 反应体积的大小对于反应的结果是有影响的，体积越大，空气比热小的弱点就越明显，所以空气加热的仪器使用的反应体积都比较小。但使用毛细管的缺点是试剂的专一性高，通用性差。同时一次反应仅能检测 32 个样品。

Corbett 的 Roter-Gene 也是离心式、空气加热的定量 PCR 仪。Corbett 的 Rotor-Gene 3000 标准型是真正独立的 4 通道（可建立新通道）系统，有 4 个独立的 LED 激发光源（470nm/530nm/585nm/625nm），以保证最少的光谱交叉（<1%）。采用 6 个检测滤光片，可检测荧光包括 FAM/SYBR Green I、TET、VIC/JOE、HEX、Max、NED/TAMRA/Cy3、ROX/Texas Red 和 Cy5、Cy5.5 等。该仪器的适用性较宽，试剂系统开放，可适用 TaqMan 探针、荧光染料 SYBR Green I、分子信标和 FRET 探针等。Rotor-Gene 3000 灵敏度高，有宽达 12 个数量级的线性范围，可精确区分低达 1～3 个拷贝的基因，重复性极佳（$r>0.99935$）。由于反应过程中转子一直以恒定的低速旋转，使得样品间的温度均一性极佳，同一热反应室的反应条件完全相同，同一光学通路的测量通道完全相同，每标本每循环检测 32 次，满足高精度和一致性要求。Rotor-Gene 3000 有 36ml×0.2ml 和 72ml×0.1ml 两种转子，通过薄壁管侧壁而非管底进行信号检测，因而可以使用普通的 0.2ml PCR 管，并允许在试管盖上标记，降低了使用成本。Rotor-Gene 3000 的温控速度虽然不如 LightCycler，但优于多数的半导体加热模块类型的仪器，能达到 5℃/s（管内实际升温速度达到 2.5℃/s）。Corbett 还有一个光学变性专利：让待扩增样品预先进行一次熔解曲线程序，预先找到代表全部双链 DNA 解链的峰值对应温度，在其后的反应中就无须总是将变性温度设为 94℃，也不需要延长孵育时间，可大大缩短反应时间。Rotor-Gene 主要的缺点是通量低，样品数量较少。

二、q-PCR 仪的性能指标

（一）通量

针对不同的实验需求（检测数量的大小、检测时间的长短和检测项目的多少等），可选用不同通量（检测量）的 PCR 仪。ABI 的 Prism 7500、Bio-Rad 公司的 CFX96 可一次容纳 96 个样品。Corbett 的 Rotor-Gene 3000 每次的最大样本数为 36 个（0.2ml）或 72 个（0.1ml），LightCycler1.5/2.0 的每次最大样本数为 32 个。ABI 的 Prism 7900HT、Roche 公司的 LightCyclerR480 可同时检测 96/384 个样品，对于需要高通量的实验具有很大的应用价值。

（二）灵活性

针对多数科研实验室的仪器使用频率高、时间长的问题，Bio-Rad 公司的 CFX96

的温度梯度功能，允许不同退火温度的 PCR 反应同时进行，在程序中的任何一步都可以使用温差高达 24℃的温度梯度。ABI 公司的 StepOnePlus（96 孔）具有性能独特的 VeriFlex 加热块，它具有 6 个可独立控温的 peltier 加热块，并且可以精确控温。这些功能为具有优化得到的有不同退火温度的引物和探针的用户提供了操作的灵活性。

另外，ABI 的 7900 和 Roche 的 LightCycler 480 均可选择将 96 孔槽变为 384 孔槽。StepOne 可升级到 StepOnePlus 系统。离心式的双通道 Rotor-gene3000A 可以根据研究的需要升级成四通道的荧光定量 PCR 仪。Eppendorf 公司 Mastercycler ep，可以升级为 Mastercycler ep realplex 荧光定量 PCR 仪，而且有 4 种可选择型号：2 通道银质、铝制模块和 4 通道银质、铝制模块。实验室可以根据自己的经费和实验需要购买、升级荧光定量 PCR 仪。

（三）检测通道

为了节省试剂和时间，在短时间内获得更多结果，目前更多的实验室采用多重 PCR 实验。Roche 公司的 LightCycler2.0 和 LightCyclerR480 具有 6 个检测通道，能较好地满足上述需求，其他的仪器则多为 3～4 通道检测。

（四）运行速度

荧光定量 PCR 仪众多技术参数中的重要指标是升降温速度。更快地升降温可以缩短反应时间，同时缩短非特异性结合及反应的时间，提高 PCR 的特异性。为了满足实验的需求，各个厂家相继推出能快速运行的荧光定量 PCR 仪。例如，Roche 的 Lightcycler1.5/2.0 可在 0.5h 左右完成 30～40 个循环。ABI 的 7500 可以选配 FAST 模块，达到 5℃/s 的升降温速度，可在 40min 左右完成 30～40 个循环。StepOne 和 StepOne Plus 也可进行快速模式 PCR 反应，可在 40min 内完成 40 个循环反应。最近 Roche 新推出的 LightCycler 480 II 和 Eppendorf 新推出的 Mastercycler ep realplex4S 和 2S 采用银质模块，升降温的速度可达到 4.8℃/s、6℃/s 和 4.5℃/s，是目前同类产品中升降温速度最快的荧光定量 PCR 仪。

（五）试剂和耗材开放程度

使用通用的耗材和试剂可显著降低实验成本，如果作为临床 PCR 实验室，在选择仪器时应考虑到这一点。上述仪器中，Roche 使用的耗材的通用性差、成本高（毛细反应管），且每次的检测通量低，在高样品量时，增加了阴性、阳性对照样品的数量。其他常见的仪器均可在不同程度达到耗材和试剂开放。

第五节　实时定量 PCR 的主要应用

目前，实时荧光 PCR 技术已经被广泛应用于基础科学研究、临床诊断、疾病研究及药物研发等领域，其中最主要的应用集中在以下几个方面。

一、DNA 或 RNA 的定量检测分析

包括病原微生物或病毒含量的检测、转基因动植物转基因拷贝数的检测、RNAi 基因失活率的检测等。实时荧光定量 PCR 技术可以快速、准确定量测出高至 10^{10}，低至 10^{1} 个拷贝数的病原体，定量范围极宽。已经应用于细菌、病毒、衣原体、支原体、寄生虫等许多病原体的检测研究。

二、基因表达差异分析

实时定量 PCR 技术对 mRNA 水平的检测比 Northern 杂交、RT-PCR 等定量方法要方便、快速、准确得多，可以对不同组织、不同处理之间（如药物处理、物理处理和化学处理等）、不同发育阶段基因表达的差异进行检测。检测各基因在组织细胞中的表达丰度、分析基因的表达调控、mRNA 的表达模式等研究。

三、在医学及药物开发中的检测应用

实时定量 PCR 的出现克服了传统 PCR 技术普遍存在的假阳性及不能定量等问题，使得 PCR 技术更广泛地应用于临床及其药物方面，目前已经在肿瘤研究、乙肝诊断、病毒检测、动物疾病检测与防御、药物疗效的评价与考核等方面，为临床理论研究、治疗疾病和药物开发提供了客观的物质基础。在药物研究过程中，可以快速了解药物对疾病进程的影响。为新药开发节约大量的人力、时间和资金。

四、遗传学分析中的应用

实时定量 PCR 技术还可以用在点突变分析、等位基因分析、DNA 甲基化检测、单核苷酸多态性（SNP）分析及特异突变基因检测等。

（李　楠）

参考文献

Aiyar A, Xiang Y, Leis J. 1996. Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. Methods Mol Biol, 57: 177～191.

Clementi M, Menzo S, Bagnarelli P, et al. 1993. Quantitative PCR and RT-PCR in virology. PCR Methods Appl, 2 (3): 191～196.

Frillingos S, Sahin-Toth M, Wu J, et al. 1998. Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. FASEB J, 12 (13): 1281～1299.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′→3′ exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A, 88 (16): 7276～7280.

Honore-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, et al. 2003. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. J Clin Microbiol, 41 (6): 2323～2329.

Ho SN, Hunt HD, Horton RM, et al. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene, 77 (1): 51～59.

Kaltenboeck B, Wang C. 2005. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. Adv Clin Chem, 40: 219～259.

Ruiz-Ponte C, Carracedo A, Barros F. 2006. Duplication and deletion analysis by fluorescent real-time PCR-based genotyping. Clin Chim Acta, 363 (1-2): 138～146.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239 (4839): 487～491.

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A, 86 (24): 9717～9721.

第十八章　基因克隆和表达技术

机体的免疫系统具有多种多样的免疫细胞，直接参与机体免疫功能的实施和调控。无论是天然免疫还是获得性免疫，其发挥免疫功能的过程都受到各种免疫分子的调节。因此，在分子水平阐述免疫细胞的功能和调节的机制是免疫学研究的重要方向。在分子水平对免疫相关分子进行研究离不开人为调节免疫分子的表达水平或者活性。一般情况下，目前人为的分子水平干预措施主要包括4种情况：①过表达（overexpression）全长的免疫分子；②过表达功能活化（dominant active）或者功能缺失（dominant negative）的免疫分子突变体；③通过反义寡核苷酸、RNA干扰、microRNA等技术手段降低目标免疫分子的表达；④通过转基因（transgene）或者基因敲除（knockout）的方式在整体水平调节免疫分子的表达水平或者活性。

在本章中将重点介绍过表达全长免疫分子的方法和技术。

基因克隆（gene cloning）和基因表达（gene expression）是两个不同但是密切联系的技术。基因克隆又称分子克隆（molecular cloning），是指通过体外重组技术将一段目的DNA经切割、连接插入适当载体，并导入宿主细胞，扩增形成大量子代分子的过程。而基因表达则是指将通过基因克隆所得的含有目的基因的表达载体导入宿主细胞（如原核的大肠杆菌、毕赤酵母真菌、植物、昆虫或者哺乳动物等），并且使目的基因在宿主细胞内转录、翻译并得到目的基因编码的蛋白质的过程。因此，过表达某一种免疫分子一般需要先通过基因克隆获得表达载体，然后再通过基因表达技术将外源基因导入宿主细胞并得以表达。在免疫学研究中最常用的宿主细胞包括大肠杆菌、酵母、小鼠和人的细胞或细胞系等，本章的技术介绍也将重点集中在这几种宿主细胞相关的技术方法上。

过表达某一种免疫分子一般需要以下几个基本的过程（表18-1）。

表18-1　过表达免疫分子的基本步骤和主要操作

主要步骤	主要操作
获得目标免疫分子的全长编码序列	1. 确定目标基因的表达要求
	2. GenBank或其他数据库寻找目标基因的编码序列
	3. 确定起始密码和终止密码，以及该目的基因自身的限制酶切位点
扩增该目标免疫分子并将其连接入适当的克隆载体	1. 设计合成包含限制酶位点的引物，PCR法扩增基因
	2. PCR产物和克隆用载体进行限制酶切
	3. 酶切产物回收，连接入酶切后载体片段
扩增并纯化包含目标免疫分子的载体	1. 连接产物转化感受态大肠杆菌
	2. 挑选阳性克隆
	3. 细菌培养基内筛选压力条件下扩增
	4. 质粒纯化和鉴定（酶切＋载体DNA测序）

续表

主要步骤	主要操作
获得表达载体	1. 选择合适的酶切位点，然后将包含目的基因的片段连入相应的表达载体 2. 扩增、纯化表达载体
将表达载体导入宿主细胞并检测目的基因的表达	1. 表达载体转染人或小鼠等免疫细胞 2. RT-PCR、Western 印迹、ELISA、FACS 等方法鉴定目的基因表达

1）获得该目标免疫分子的全长编码序列，即包含完整开放阅读框（open reading frame，ORF）的 cDNA 序列，含有起始密码子和终止密码子。

2）扩增该目标免疫分子并将其连接入适当的载体（vector）。

3）扩增并纯化包含目标免疫分子的载体。

4）直接或通过亚克隆（即对已经获得的目的 DNA 片段进行重新克隆，其目的在于对目的 DNA 进行进一步分析或者进行重组改造）获得表达载体。

5）将表达载体导入宿主细胞并检测目的基因的表达。如果要进一步得到目标免疫分子的蛋白质则还需要通过蛋白质纯化的步骤来获取，如在大肠杆菌中表达、纯化谷胱甘肽-*S*-转移酶（glutathione-*S*-transferase，GST）融合蛋白。

在这些过程中至为关键的步骤是载体构建和外源基因导入宿主细胞。载体构建的过程包含一个完整的分子克隆过程，即将外源 DNA 连接入某种载体并扩增获得包含目的基因的载体的过程。其基本步骤包括：制备目的基因→将目的基因与载体用限制性内切酶切割和连接，制成 DNA 重组→导入宿主细胞→筛选、鉴定→扩增和表达。而将外源基因导入细胞则是指通过转化（transformation；如大肠杆菌感受态转化）、转染（transfection；如真核表达载体通过脂质体、电穿孔等方式导入昆虫、哺乳动物细胞）或者转导（transduction；如病毒介导的 DNA 导入各种昆虫、哺乳动物细胞）等方式使外源基因得以进入宿主细胞并扩增、转录、翻译的过程。因此，过表达全长免疫分子的成功与否的决定因素在于载体的选择和外源基因能否有效导入。当大肠杆菌作为宿主细胞时，外源基因的导入往往效率较高，因此载体的选择相对容易；但是，要将哺乳动物细胞作为宿主细胞时，外源基因的导入效率参差不齐，如质粒直接转染的效率往往低于病毒介导的外源基因导入。而且，作为免疫细胞，尤其是一些原代的免疫细胞（如分离纯化的脾脏 T 淋巴细胞），往往大部分属于难以转染的细胞，与常规的细胞系（如实体瘤贴壁细胞系）所采用的试剂和方法有较大差别，需要仔细地选择适当的载体和基因导入方法。

第一节　常用基因克隆和表达载体的分类、特征和用途

载体，是指能有效地运载外源 DNA 片段（基因）进入宿主细胞内的可自主复制的 DNA 片段，即载体同外源 DNA 在体外组成重组 DNA 分子，进入宿主细胞后能进行自

我复制。免疫学研究中常用载体主要有 4 类：质粒（plasmid）载体；噬菌体（bacteriophage）载体，病毒载体，上述载体相互组合或与其他基因组 DNA 组合成的载体。比较普及和常用的载体主要是质粒载体和病毒载体。这些载体根据其用途可分为克隆载体和表达载体；根据进入宿主细胞的方式，可将表达载体分为病毒载体与质粒载体，其中病毒载体是以病毒颗粒的方式，通过病毒包膜蛋白与宿主细胞膜的相互作用使外源基因进入到细胞内；根据载体进入的宿主细胞不同，又分为原核细胞（主要是指细菌）和真核细胞（主要是指哺乳动物细胞）表达载体。在实际操作中，需要根据运载的目的 DNA 片段大小和将来要进入的宿主细胞选用合适的载体。

这些载体一般需具有以下共同的特点。①有某种限制酶的一个切点，最好是有多种限制酶的切点，而且每种酶的切点只有一个；②外源 DNA 插入后不影响载体在宿主细胞中进行自我复制，载体应对宿主细胞无害，以及载体能接纳尽可能大的外源 DNA 片段；③有利于选择的标记基因，可以很方便地知道外源 DNA 是否已经插入，利于把接受了载体的宿主细胞选出；④具有促进外源 DNA 表达的调控区。

在免疫学研究中，无论是质粒载体还是病毒载体，其最基本的结构基础都是质粒。因此质粒的构建是基因表达的最基本的技术环节。而病毒载体的获得往往是利用质粒构建技术获得相应载体，然后再在特定包装细胞系（如 HEK293、293T 等）内获得完整的具有感染能力的病毒颗粒。

一、常用克隆载体

克隆载体是指能够在细菌等宿主细胞内大量扩增并复制的载体，其基本要求是需要包含以下基本元件：含有能够在细菌或酵母等细胞中进行扩增的复制起始点（origin of replication，ori）；具有多个克隆位点，即限制酶酶切位点，往往要求具有唯一性，用于载体的限制酶切割用；具有抗生素抗性或其他特殊筛选标志，用于阳性克隆的筛选。克隆载体一般不能在宿主细胞内完成蛋白质的合成，仅仅作为基因克隆过程中目的基因的“容器”。要完成目的基因的表达往往需要进一步的克隆，如将目的基因片段酶切、回收、纯化，然后再克隆到适当的表达载体，完成目的免疫分子的表达。目前有许多公司都生产分子克隆用载体，如 Progemar 公司、Novagen 公司、Stratagene 公司、Clontech 公司、Invitrogen 公司等。这里仅介绍几种本实验室常用的几种克隆载体。

Promega 公司的 pGEM-3Zf(－) 载体即是一种典型的克隆载体，可以应用于标准的分子克隆。该载体包含 f1 复制起始点、多个克隆位点、氨苄青霉素抗性以及 LacZ 筛选位点以及 T7/SP6 RNA 聚合酶启动子。其主要特点是可以进行双标志筛选，即氨苄抗性和 LacZ 筛选。当外源基因插入后，β-半乳糖苷酶失活，在 X-gal 存在条件下使阴性细菌克隆呈蓝色，而阳性克隆为白色。

其他的常用克隆载体还有 pGEM-T、pGEM-T Easy、pBR 322 质粒载体、pUC 系列载体等。其中 pGEM-T 和 pGEM-T Easy 载体系统主要特征是可以直接将 PCR 产物与载体进行连接，大大简化了克隆步骤。

pBR322 质粒载体则是最为经典而理想的克隆载体，应用广泛而稳定，该载体由

4363个碱基对组成，有一个复制起点，携带氨苄青霉素抗性基因和四环素抗性基因，具有以下优点：它的拷贝数比较高（60个拷贝/细胞），利于载体DNA的制备，也利于外源基因的增殖；它的分子质量小，可使外源DNA插入后不致因分子质量太大而影响稳定性；有*Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ、*Pst*Ⅰ、*Sal*Ⅰ等多个限制酶的单一识别位点，可适于多种限制酶产生的DNA片段的插入；有氨苄青霉素和四环素等选择标记，便于重组体细胞的选择；它不能自我转移，便于生物学防护以保证安全。

pUC系列质粒是2.7kb的双链DNA质粒，有一个复制起点、一个氨苄青霉素抗性基因和一个多克隆位点，多克隆位点处于表达*LacZ*基因产物β-半乳糖苷酶的氨基端。用pUC质粒转化*LacZ*基因有突变的大肠杆菌株（M15）时，因为由质粒表达的α肽补充了大肠杆菌缺失的α肽，所以恢复了分解半乳糖的能力。在加入IPTG和X-gal的培养基上，长出蓝色克隆。如果在多克隆位点内插入外源DNA，由于它破坏了α肽的表达，因而在加入IPTG和X-gal的培养基中不能长出蓝色克隆。

二、常用表达载体的特征、应用和选择

表达载体是指不仅能够在宿主体内复制，而且能够通过转录、翻译等过程在宿主细胞内表达出相应蛋白质的载体。根据载体进入宿主细胞的方式分为质粒载体和病毒载体，这里重点介绍质粒载体。通常表达载体质粒上的元件包括启动子、多克隆位点、终止密码、融合标签（如HA、Flag、Myc、His等标签）、复制子、筛选标记或报道基因等。通常表达载体都会选用高拷贝的复制子。筛选标记通常为氨苄青霉素抗性，卡那霉素或者是新霉素次之，四环素、红霉素和氯霉素等已经应用地越来越少。另外，表达载体还可以使用绿色荧光蛋白（GFP）、半乳糖苷酶、荧光素酶及一些融合表达的标签来作为报道基因，显示表达的效率。

根据宿主细胞的不同，表达载体可以分为原核表达载体和真核表达载体。这两种载体具有共同的元件，如启动子（promoter）、多克隆位点、终止密码、筛选标记等。但是基于原核细胞和真核细胞的基因表达调控方式不同，这两种表达载体也有基本元件的差异，尤其是在启动子和核糖体结合位点的序列特征方面有极大的差异。目前商品化的原核和真核表达载体基本都满足表达载体的基本要求，因此一般只要保证目的基因的正确插入（如正确的开放阅读框）即可以达成表达目的基因的目标。

启动子是DNA链上一段能与RNA聚合酶结合并起始RNA合成的序列，它是基因表达不可缺少的重要调控序列。没有启动子，基因就不能转录。原核启动子由两段彼此分开且又高度保守的核苷酸序列组成，分别为在转录起始点上游5～10bp处的富含A和T的区域（称为Pribnow盒，又名TATA盒或－10区）和在距转录起始位点上游35bp处的－35区。在原核表达系统中常用的启动子主要有Lac（乳糖启动子）、Trp（色氨酸启动子）、Tac（乳糖和色氨酸杂合启动子）、IPL（I噬菌体的左向启动子）、T7噬菌体启动子等。原核表达载体的这些启动子往往具有诱导表达的特点，如异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）、乳糖、热诱导等条件下的诱导表达。

真核启动子一般由TATA盒和CAAT盒构成，它们分别距转录起始位点上游约30bp和80bp，负责调控基因的表达。多数真核表达载体使用转录效率较高的启动子，

如猴空泡病毒早期启动子（SV40）、劳氏瘤病毒启动子（RSV）、腺病毒主要晚期启动子（ADV）和人巨细胞病毒早期启动子（CMV）。而且真核表达载体一般都有至少一个强的增强子（enhancer）序列，它们通常来源于CMV、SV40或者RSV病毒。目前常用的真核表达载体中，均集成有完整的增强子启动子元件。根据增强子来源的不同可以将它们分为病毒源和细胞源两类。病毒源的增强子-启动子来源于病毒基因组，其中来自双链DNA病毒的有SV40、ADV和CMV等；来自RNA病毒的有逆转录病毒长末端重复序列（LTR）。这些逆转录病毒包括HIV、AMV、RSV和MMLV等。在这些病毒源的增强子-启动子中，CMV和LTR这两种的效率比较高，所以在很多高效的真核表达质粒中都采用这两种增强子-启动子元件。细胞源的增强子-启动子多数是常规表达量高的持家基因顺式调控元件，为真核细胞本身所固有。常用的有金属硫蛋白基因启动子（MMT）、肽链延长因子启动子（EF）、热激蛋白启动子（HSP）、肌酸激酶启动子（MCK）和β-肌动蛋白启动子等。

原核表达载体上有核糖体的结合位点，它们是起始密码子AUG和一段位于AUG上游3～10bp处的由3～9bp组成的序列（称为Shine-Dalgarno序列，简称SD序列）。这段序列富含嘌呤核苷酸，是核糖体RNA的识别与结合位点。而真核表达载体的起始密码周围则需要含有Kozak序列，满足Kozak规则才能够最大量地促使目的基因的转录和翻译。

最常用的原核表达宿主细胞是大肠杆菌。大肠杆菌培养操作简单、生长繁殖快、价格低廉，表达外源基因产物的水平远高于其他基因表达系统，表达的目的蛋白量甚至能超过细菌总蛋白量的80%。但是，当要将真核基因放入原核细胞中表达产生蛋白质时，原核系统就表现出许多缺陷：如没有真核转录后加工的功能，不能进行mRNA的剪接，所以只能表达cDNA而不能表达真核的基因组基因；没有真核翻译后加工的功能，表达产生的蛋白质不能进行糖基化、磷酸化等修饰，难以形成正确的二硫键配对和空间构象折叠，因而产生的蛋白质常没有足够的生物学活性；表达的蛋白质经常是不溶的，会在细菌内聚集成包含体（inclusion body），尤其当表达目的蛋白量超过细菌体总蛋白量10%时，就很容易形成包含体。因此，真核表达载体是最能够模拟目标分子的生物学功能和活性的表达工具，但是在需要大量蛋白质（如细胞因子的原核表达）、对于蛋白质生物学活性要求不高、仅关注蛋白质一级结构或者二级结构的特征时，仍然可以选择原核表达载体。

（一）常用原核表达载体

原核表达载体作为免疫学研究的工具经常应用于表达和纯化免疫分子的蛋白质，以应用于酶活性分析、寻找相互作用分子、空间结构的解析等。因此，免疫分子的原核表达的目的往往是表达目的蛋白并且进一步有效地分离纯化获得目标蛋白。为满足该目的，通常采用融合蛋白的表达形式，并利用载体编码的蛋白质或多肽的特殊性质对目标蛋白进行分离和纯化。用作分离的载体蛋白被称为标签蛋白或标签多肽，常用的有谷胱甘肽-S-转移酶（GST）、六聚组氨酸肽（polyHis-6）、蛋白质A（protein A）和纤维素结合位点（cellulose binding domain）等。但是，当加入的标签影响蛋白质的结构和功

能时，则需要采用不含标签蛋白的表达系统。

1. pET 系列原核表达载体

pET 系统是有史以来在 *E. coli* 中克隆表达重组蛋白的功能最强大的系统。目的基因被克隆到 pET 质粒载体上，受噬菌体 T7 强转录及翻译信号控制；表达由宿主细胞提供的 T7 RNA 聚合酶诱导。由 Novagen 公司研发的该系列载体目前大概有近 50 种原核表达载体，适用于各种可溶性蛋白和其他难表达蛋白在各种菌株内的表达。到目前为止，已经有超万种蛋白质得以高效表达。蛋白质表达的高效性和所表达蛋白质的多样性是 pET 系统的最大优势。其他优点还有很多种：在任何大肠杆菌表达系统中，基础表达水平最低；真正的实现蛋白质表达水平的可控可调表达；提供各种不同融合标签和表达系统配置，常用标签很多，如 GST、硫氧还蛋白（Trx）、NusA（N utilization substance A）、His 等；该系统提供可溶性蛋白生产、二硫键形成、蛋白质外运和多肽生产等专用载体和宿主菌；许多宿主菌株以感受态细胞形式提供，可立即用于转化。所有 pET 载体以及相关产品均以试剂盒形式提供，用户可以很方便地进行克隆、表达检测以及纯化目的蛋白的所有操作。因此，pET 系统往往是原核表达的首选。

2. pQE 系列原核表达载体

pQE 系列载体是 Qiagen 公司研发的表达 His 融合蛋白的系统。pQE 系列的表达载体一般情况下需要在 M15 菌株中进行表达，但是改良的 pQE80L 系列就没有这种约束，它可以在任意大肠杆菌菌株中进行表达。该系列载体的优点是：His 融合标签分子质量小，对目的基因影响小；表达效率较高，可以实现诱导表达，适用于对大肠杆菌有毒性的免疫分子的表达；His 标签可以去除，一种是利用二肽氨基肽酶Ⅰ（DAPase），另外一种是利用 Xa 因子；可以使用镍金属螯合层析分离纯化目的蛋白。

3. pGEX 系列原核表达载体

pGEX 系列 GST 融合蛋白表达系统是 Amersham Pharmacia 公司研发的表达系统，用于多种蛋白质的 GST 融合表达。基于 GST 蛋白的特点，该系列载体可以极大地改善目的蛋白的可溶性，并在一定程度上促进蛋白质的正确折叠，一般应用于胞内可溶性分子的表达。该系统的优点主要是：GST 融合蛋白纯化方便；GST 可以通过凝血蛋白酶 Xa 去除；诱导表达条件可以多重优化。但是在实际操作过程中，一旦目的蛋白形成包含体，则将极大地增加工作量，并可能影响最终所得蛋白质的质量。

4. pBV220 原核表达载体

pBV220 是我国预防医学科学院病毒研究所自行构建的。使用了很强的 PRPL 双启动子（是大肠杆菌Ⅰ噬菌体中控制早期转录的启动子，具有极强的起始 RNA 转录的功能），含有编码温度敏感性阻遏蛋白的 *cI857* 基因。在 30～32℃时产生的阻遏蛋白能阻止 PRPL 的转录起始，细菌可以正常生长繁殖；42℃时该阻遏蛋白发生构象变化而失活，基因开始转录而表达。因此，改变工程菌的培养温度即可控制目的基因的表达，这

一点比用诱导剂诱导表达的系统要节省操作步骤和成本，在大规模基因表达中优点尤其明显。而且该载体是少有的不含蛋白质标签的表达载体之一，但是同时也增加了后续蛋白质纯化的难度。

5. 分泌型原核表达载体

除了在细胞内表达外，还可让表达的蛋白质分泌到细胞外或细胞周质区中。这种表达方式可避免细胞内蛋白酶的降解，可以使表达的蛋白质部分正确折叠，或可以去除氨基末端的甲硫氨酸，从而达到维护目标蛋白活性的目的。利用原核细胞的信号肽序列作为融合标签可将融合蛋白分泌到细胞外，可利用的信号肽有碱性磷酸酶的信号肽和蛋白质 A 的信号肽。表达载体 pEZZ18 的表达元件有 *lac* 启动子、蛋白质 A 的信号肽序列和两个合成的 Z 功能域（domain）。来自金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的蛋白质 A 具有与抗体 IgG 结合的能力，因此融合蛋白表达后，在信号肽序列的指导下，分泌到培养基中。然后用固定了 IgG 的琼脂糖层析柱，通过与 ZZ 功能域的结合而得到纯化的融合蛋白。

（二）常用真核表达载体

大部分真核表达载体属于穿梭载体（shuttle vector），是能够在两类不同宿主中复制、增殖和选择的载体。例如，有些载体既能在原核细胞中复制又能在真核细胞中复制，或既能在革兰氏阴性菌 *E. coli* 中复制又能在革兰氏阳性细菌中复制。这类载体主要是质粒载体。因此，真核表达载体有时候可以直接满足克隆载体和表达载体的双重需求，可以在大肠杆菌内扩增，又可以在真核细胞内表达。但是，考虑到克隆的效率以及克隆过程中的突变可能，一般情况下建议采用克隆载体来克隆目的基因，然后再将基因片段连接入表达载体。特殊情况下，如目的基因自身含有所有克隆载体的限制酶克隆位点而真核表达载体有适合的限制酶克隆位点，则可以考虑用真核表达载体作为克隆载体和表达载体。最新的 TOPO 系列载体可以省略这些亚克隆的步骤。由于真核表达载体可以完全模拟外源基因原本在真核细胞内的转录、翻译和翻译后修饰的所有环节，因此真核表达载体所表达的蛋白质的结构和活性均可以保持。根据宿主细胞的差异，真核表达载体分为酵母表达载体、昆虫表达载体和哺乳动物表达载体 3 类。在免疫学研究中由于主要使用的细胞和动物模型主要是小鼠或者人类相关的，因此常用的表达载体是哺乳动物表达系统适合的表达载体。但是，如果研究的目的是获得大量天然的、高活性的蛋白质，则酵母表达系统和昆虫表达系统相关真核表达载体也是适当的选择之一。

各种表达系统各有其优缺点（这几种表达系统的详细比较参见表 18-2 和表 18-3），酵母和昆虫细胞系统蛋白表达水平高，生产成本低，但它们的加工修饰体系与哺乳动物细胞不完全相同；哺乳动物细胞产生的蛋白质更接近于天然蛋白质，但其表达量低、操作繁琐。各种表达系统由于翻译后的加工不完全相同，因而产生的重组蛋白的生物学活性和免疫原性有时会有差别。因此，选择表达系统时，必须充分考虑各种因素，如所需表达的蛋白质性质、实验条件、生产成本、表达水平、安全性等，权衡利弊后再选择相应的表达系统。

表 18-2　常见表达系统的特征

参数	表达系统			
	大肠杆菌	酵母	昆虫	哺乳动物
生长	快(30min)	快(90min)	慢(18～24h)	慢(24h)
培养基消耗	低	低	高	高
表达水平	高	低-高	低-高	低-中等
翻译后修饰				
蛋白质折叠	不佳	较好	正确折叠	正确折叠
N-糖基化	无	高度甘露糖化	简单,无唾液酸	有
O-糖基化	无	有	有	有
磷酸化	无	有	有	有
乙酰化	无	有	有	有
酰化	无	有	有	有
γ-羧基化	无	无	无	有

表 18-3　常见表达系统的比较

参数	表达系统			
	大肠杆菌	酵母	昆虫	哺乳动物
优点	规模化、低成本、省时、简便	真核蛋白的翻译修饰、发酵法规模表达、易培养	接近哺乳动物蛋白质翻译修饰、蛋白质得率较高	最佳的蛋白质翻译修饰
缺点	蛋白质可溶性较差	需要发酵,培养条件需优化	培养条件较高	蛋白质得率低
用途	蛋白质结构解析、抗体制备、功能分析、蛋白质相互作用	蛋白质结构解析、抗体制备、功能分析、蛋白质相互作用	蛋白质结构解析、抗体制备、功能分析	抗体制备、功能分析、蛋白质相互作用
商用载体	pET、pGEX、pTrc、pQE、pLEX,pBAD、pPRO EXHT、PRO Bacterial、PinPoint Xa、pFLAG-ATS、pT7-FLAG 等	pPIC、pYC、pYES2、pYEX-BX、pGBKT7 等	pBAC、pFastBac、pMelBac、BacPak、pPolh-FLAG 等	pTK-neo、pcDNA、pMAM、pRluc-C、pBudCE4.1、pBC1、pVAX1、pCMS-EGFP、pGFP2-C、pFLAG-CMV、pBICEP-CMV 等

1. 酵母表达载体

最早应用的酵母是酿酒酵母，后来人们又相继开发了裂殖酵母、克鲁维酸酵母、甲醇酵母等，其中，甲醇酵母表达系统是目前应用最广泛的酵母表达系统，以 Pichia Pastoris 应用最多。甲醇酵母的表达载体为整合型质粒，载体中含有与酵母染色体中同源的序列，因而比较容易整合入酵母染色体中。利用甲醇酵母表达外源性蛋白质，其产量往往可达克级。但是，甲醇是高毒性、高危险性化工产品，使得实验操作过程中存在不小的危害性。更换不需要甲醇诱导的启动子（如 GAP、FLD1、PEX8、YPTI 等）可以解决毒性问题。酵母表达系统由于兼具原核以及真核表达系统的优点，在蛋白质表达领

域中得到日益广泛的应用。目前常用的商业化酵母表达载体主要有 Invitrogen 公司生产的 PichiaPink 毕赤酵母表达系统、Stratagene 公司生产的酿酒酵母表达系统 pESC 系列载体。另外，Invitrogen 公司还提供 pGAPZ、pAO815、pPIC、pYES 等系列酵母表达载体，Novagen 公司、Sigma 公司等也提供酵母表达载体。

PichiaPink 毕赤酵母表达系统主要应用于表达分泌型重组蛋白，包含 pPink-HC、pPink-LC 和 pPinkα-LC 等载体。采用的是乙醇氧化酶（alcohol oxidase，AOX1）的启动子，因此能够在甲醇诱导下表达目的蛋白。该系统具有以下优点：采用 ADE2 报道基因作为筛选标识（红白筛选），简单易行；几乎所有阳性克隆均可以表达目的蛋白；提供 3 种蛋白酶敲除细胞株，减少了蛋白酶的影响，从而减少了蛋白酶抑制剂的使用；提供 8 种分泌信号肽序列，便于分泌蛋白表达的优化；同时也可以应用于胞内蛋白的表达。缺点是甲醇具有毒性，在安全性方面需要注意。

pESC 系列载体以 Novagen 公司生产的可诱导的酿酒酵母表达系统为代表，包括 pESC-His、pESC-LEU、pESC-TRP 和 pEST-URA 等载体。该系列载体可以同时表达两个蛋白质，用于蛋白质相互作用研究，有多种带不同标签的载体供选择。这些载体包含 GAL1 和 GAL10 酵母启动子，用这些载体可以将一个或两个基因克隆入抑制性启动子控制下，当两个基因共表达时则可以通过免疫沉淀来证实相互作用。该系列载体有多种标志（包括 HIS3、TRP1、LEU2 和 URA3 等）可供筛选。另外该载体还有以下特征：带有 pUC 复制起始点，可以在 *E. coli* 中扩增；带有酵母复制起始子，可以在酵母内自主扩增；含有相互反向的两个启动子、两个多克隆位点的序列，每一个启动子下游都含有转录终止序列。

2. 昆虫表达载体

杆状病毒（Baculovirus）表达系统是目前应用最广的昆虫细胞表达系统，该系统通常采用苜蓿银纹夜蛾杆状病毒（AcNPV）作为表达载体。在 AcNPV 感染昆虫细胞的后期，核多角体基因可编码产生多角体蛋白，该蛋白质包裹病毒颗粒可形成包含体。克隆入外源基因的传递质粒与野生型 AcNPV 共转染昆虫细胞后可发生同源重组，重组后多角体基因被破坏，因而在感染细胞中不能形成包含体。利用这一特点可挑选出含重组杆状病毒的昆虫细胞，但效率比较低，且载体构建时间长，一般需要 4～6 周。一般情况下杆状病毒表达系统所能表达的外源蛋白只有少部分是分泌性的，大部分为非分泌性的。将 Hsp70（热休克蛋白 70）与外源蛋白共表达可明显提高重组蛋白的分泌水平。最近，人们又构建了杆状病毒-S2 表达系统，该系统能将重组杆状病毒转染多种昆虫细胞。重组杆状病毒感染 S2 细胞后不会引起宿主细胞的裂解，且蛋白质表达水平与鳞翅目细胞相似。因此，杆状病毒-S2 系统是一个很有应用价值的昆虫细胞表达系统。昆虫细胞表达系统，特别是杆状病毒表达系统操作安全，蛋白质表达量高，目前应用范围日益广泛。目前常用的商业化的昆虫表达载体主要有 Novagen 公司提供的 BacVector 杆状病毒稳定表达载体、InsectDirect 瞬时高产表达载体、pBiEx、pTriEx 载体；Invitrogen 公司提供的 pFastBac、pMelBac 载体；Clontech 公司提供的 BacPak 杆状病毒表达载体；以及 Sigma 公司提供的 pPolh-FLAG 表达载体等。在免疫学研究中，昆虫表达系统应用范围较有限，因此这里不做详细介绍。

3. 哺乳动物表达载体

哺乳动物表达系统经过哺乳动物细胞翻译后再加工修饰产生的外源蛋白质，在活性方面远胜于原核表达系统以及酵母、昆虫细胞等真核表达系统，更接近天然蛋白质。外源基因的体外表达一般采用质粒表达载体，常用宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、非洲绿猴肾成纤维细胞（COS）等。目前，病毒载体已成为动物体内表达外源基因的有力工具，在临床基因治疗的探索中也发挥了重要作用。痘苗病毒基因的分子质量相当大（约 187kb），利用它作为载体可同时插入几种外源基因。另外，逆转录病毒感染效率高，几乎所有免疫细胞均可通过其导入外源基因，但要注意的是，逆转录病毒可整合入宿主细胞染色体，具有潜在的危险性，因此在体内表达时应小心。由于腺病毒易于培养、纯化，宿主范围广，故采用该类病毒构建的载体被广泛应用。腺病毒载体的构建依赖于腺病毒穿梭质粒和包装载体之间的同源重组。但是哺乳动物细胞内的这种同源重组效率很低，利用细菌内同源重组法构建重组体效率会大大提高。哺乳动物表达载体在免疫学研究中极为广泛，将单独分节介绍。

第二节　哺乳动物真核表达载体

根据进入宿主细胞的方式将哺乳动物真核表达载体分为质粒载体和病毒载体两类，分别予以介绍。

一、哺乳动物质粒表达载体

质粒表达载体在科学研究中具有相当的优势，主要体现在构建简单方便、容易扩增、表达效果稳定、通常可以稳定表达等优势。但是，在免疫学研究中，质粒载体往往难以有效导入免疫细胞（尤其是悬浮的免疫细胞或原代细胞），因此极大地限制了其应用，但是随着基因导入技术的进步（改良的脂质体技术、电穿孔技术等），质粒载体依然是免疫学研究最常用的表达工具。用于哺乳动物的质粒表达载体之间基本上最主要的区别和特点在于启动子的差异，启动子能力的强弱决定了目的基因的表达水平。目前，几乎所有的商业化质粒载体均采用了强启动子（如 CMV、SV40、RSV、ADV 等启动子序列），一般都可以满足外源基因的有效表达。

目前表达质粒基本都有以下特点：含有成熟的增强子-启动子序列；可以进行多种蛋白质标签的融合表达；筛选方便，一般既含有抗生素抗性基因位点（用于大肠杆菌筛选），又含有真核细胞药物压力筛选位点（如新霉素、潮霉素、抗稻菌素等）。大多数质粒都只是一次表达一种目的基因，因此标签蛋白和报道基因一般都需要融合表达才能够满足实验要求。最近，一些新型载体利用内部核糖体插入位点（internal ribosome entry site，IRES）序列，利用其可以模拟原核细胞蛋白质转录翻译的特点，在一个载体里可以同时表达两个外源基因，如 pIRES-EGFP 载体，既可以用于表达一个目的基因，又可以同时表达 EGFP 作为目的基因表达水平的标志。这种双顺反子真核表达质粒在研究蛋白质相互作用或者生物学功能的相互调节方面具有极大的应用前景。

目前常用的质粒表达载体系统介绍如下。

1. pcDNA3 系列载体

Invitrogen 公司的 pcDNA3 系列载体目前已经发展到十几种，目前常用的有 pcDNA3.1、pcDNA4.1、pcDNA5 和 pcDNA6 等系列载体，可以应用于高水平的外源基因表达和纯化。由于该系列载体提供包含多种压力筛选标志（如 G418、潮霉素等），因此既可以瞬时表达，也可以通过药物筛选实现稳定表达。启动子为 CMV，可以在广泛的细胞内得以表达，另外也可以在表达 SV40 大 T 抗原的细胞内（如 COS-7）实现附加型复制和表达。该系列载体还提供多种蛋白质标签以供选择（如 Myc、Xpress、Flag、His 等），是目前应用最为广泛的质粒载体之一。

2. pCMV 系列载体

Novagen 和 Stratagene 公司的 pCMV 系列载体包括 pCMV-Script、pCMV-Tag1～pCMV-Tag5 等表达载体。这些载体适用于 PCR 克隆、加入蛋白标签，甚至在原核细胞和真核细胞同时表达等。该系列载体一般包括大肠杆菌筛选用的卡那霉素抗性标志以及哺乳动物细胞筛选用的 G418 抗性标志，因此可以进行高效瞬时表达和稳定表达。其中 pCMV-Script 载体可以直接与 PCR 产物进行连接，简化克隆步骤。pCMV-Tag1～pCMV-Tag 5 载体提供了多种蛋白质标签以供选择，如 Flag、Myc 等，而且既可以将基因融合在标签的氨基端，也可以将基因融合在标签的羧基端。其中 pCMV-Tag1 提供了两个多克隆位点供选择，方便目的基因的氨基端 Flag 融合或羧基端 Myc 融合。

3. pEGFP 系列载体

Clontech 公司的 pEGFP 系列载体提供一种构建目的基因和荧光蛋白的方法，或者自身也可以单独使用，作为报道基因显示转染效率。载体为真核细胞表达载体，采用强大的 SV40 和 CMV 启动子，并且能够进行真核细胞抗性筛选。pEGFP 是一种优化的突变型 GFP，使其产生的荧光较普通 GFP 强 35 倍，大大增强了其报道基因的敏感度。pEGFP 与其他蛋白质的融合表达已有很多成功的例子，而且其 N 端及 C 端均可融合，并不影响其发光。该系列载体具有以下优点：在荧光显微镜下，用波长约 488nm 的激光激发后，即可观察到绿色荧光，直接、简捷、方便地检测目的基因的亚细胞定位和表达水平；无需任何的作用底物或共作用物，检测的灵敏度不受反应效率的影响，保证了极高的检出率；EGFP 蛋白本身性质稳定，可在多种异源生物中表达且无细胞毒性。类似的载体还有表达红色或者黄色荧光蛋白的载体。

4. Gateway 技术

Gateway 技术是一项基因克隆和表达的新技术，通过 Gateway 技术能够克隆一个或多个基因进入到任何蛋白质表达系统。这项体外技术大大简化了基因克隆和亚克隆的步骤，克隆效率却高于 95%。当基因在目的表达载体之间快速简便地穿梭时，可以保证正确的方向和阅读框。此外，Gateway 技术也有助于进行带不同数目纯化和检测标签蛋白的表达。Gateway 技术具有以下优点：去除冗长的亚克隆步骤，节省操作时间；能同时将基因转移到多个表达系统；在选择的任何系统，如体外、细菌、酵母、昆虫或哺乳动物系统，均可以进行分析表达。Gateway 技术是克隆和亚克隆 DNA 序列的一项新

颖的通用系统，便于功能基因的分析和蛋白质的表达。一旦进入这个多功能的操作系统，DNA 片段可以通过位点特异的重组在载体之间转移。因此，如果在不明确目标基因的特点、需要更换多种蛋白标签或纯化条件、优化实验方案、需要使用多个表达系统时，可以使用该技术（如 Invitrogen 公司提供的多种载体系统）来进行研究。

5. 哺乳动物诱导表达载体

利用哺乳动物细胞表达外源基因时，大多数情况下不需要诱导，但当表达产物对细胞有毒性时应采取诱导，这样可避免表达产物产生早期就对细胞产生影响。哺乳动物细胞中用到的诱导型载体主要与启动子有关。例如，热休克蛋白启动子可在高温下被诱导，还有重金属、糖皮质激素诱导的启动子。但这些系统存在一些共同的缺陷。例如，诱导表达特异性差；当系统处于关闭状态时表达有泄漏；诱导剂本身有毒性，常对细胞造成损伤等。Tet-on 和 Tet-off 四环素诱导表达系统解决了其中的一些缺陷，是目前应用最广泛的哺乳动物细胞诱导表达系统，该系统具有严密、高效、可控制性强的优点。类似的诱导表达系统还有蜕皮激素诱导表达系统、FK506/雷帕霉素（Rapamycin）诱导表达系统和 RU486 诱导表达系统等。目前 Clontech 和 Invitrogen 等公司均可以提供多种诱导表达系统的商业化载体。特别需要指出的是，诱导表达载体除了表达毒性基因以外，在研究基因表达水平和生物学功能关系的时候，可以通过改变诱导条件来调节目的基因的表达，具有非常良好的量效研究价值。

二、哺乳动物病毒表达载体

病毒载体（viral vector）是指利用病毒的基因组序列元件构建的可携带外源基因的载体工具，同质粒载体一样，病毒载体可以将外源基因高效导入培养细胞和整体动物组织。由于病毒载体具有高转化率和较好的靶向性，因此已广泛应用于科研和临床基因治疗。目前常见的病毒载体有腺病毒载体（adenoviruses，Ad）、腺相关病毒载体（adeno-associated viruses，AAV）、单纯疱疹病毒载体（herpes simplex virus，HSV）、逆转录病毒载体（retroviruses，RV）、慢病毒载体（lentivirus，LV）等，前面 3 种为 DNA 病毒载体，后面两种为 RNA 病毒载体。

由于病毒表达载体的构建过程较复杂，需要经过质粒载体构建、在细胞系内包装和扩增、病毒颗粒的纯化和鉴定等过程，因此在大多数生物学研究过程中大都采用质粒载体而不是病毒载体。但是，对于免疫学研究中使用的大多数免疫细胞，包括较易转染的巨噬细胞和树突状细胞，以及难以转染的 T 淋巴细胞、NK 细胞、中性粒细胞、肥大细胞等，质粒载体的转染方式均不能达到完全满意的程度。因此，病毒载体在免疫学研究中的应用相较于其他学科的研究反而更为广泛。

（一）腺病毒表达载体

腺病毒是一种 DNA 双链无包膜病毒，基因组长约 36kb，由非结构基因 E1～E5 和编码结构蛋白的基因 L1～L5 等组成。腺病毒载体的构建一般采用同源重组，现在最常用的是缺失了整个 E1A 和部分 E1B 基因的 Ad2 及 Ad5 型载体。E1 区的缺失（第一代载体）造成了病毒复制缺陷，同时为外源基因的插入提供了空间。但是这种载体有明显

的缺陷：包装能力较低；细胞毒性较强；易引发免疫反应。E1A 和 E2A 缺陷的新型第二代腺病毒载体装载容量有所增加，细胞毒性和免疫原性都有所减弱，特别适用于肿瘤的基因治疗。第三代腺病毒载体只保留了腺病毒必要的顺式作用元件及基因组两端的反向末端重复序列（inverted terminal repeat，ITR）和包装信号序列，总长不到 1kb。这种新型病毒除具有第一代载体的优点外，容量进一步扩大，最高可达 36kb，细胞毒性和免疫原性大幅度减弱，而且目的基因的表达时间大大延长，不足之处是辅助病毒产量很高。

以腺病毒为基础构建基因转移载体具有以下优点：①人类是腺病毒的天然宿主，所以比较安全；②该病毒宿主范围广泛，能将目的基因转移到分裂或静息的细胞中；③可原位感染，即将携带外源基因的重组 Ad 载体直接注入组织中，可以原位感染组织细胞，如可经口服、喷雾、气管内滴注等途径有效感染肺，如经过门静脉注射可以有效感染肝脏；④由于 Ad 感染细胞时其 DNA 不整合到宿主染色体中，潜在的致癌危险小；⑤外源基因表达水平较高，滴度高，在体外稳定，易于制备与纯化；⑥无需辅助病毒，可容纳 7.5kb 外源 DNA，甚至可包装比正常病毒 DNA 稍大的 DNA 分子（105%）；⑦能在悬浮培养体系中扩增；⑧能同时表达多个基因。

腺病毒载体的不足之处在于：①缺乏特异性，几乎可以感染所有的细胞；②腺病毒基因组不能整合到宿主细胞基因组上，不能持续表达，外源基因易随着细胞分裂或死亡而消失，表达时间短暂，需反复转导；③Ad 转录单位密集而复杂，重组困难；④免疫原性较强，注射到机体后很快会被机体的免疫系统排斥掉，使反复治疗的效果逐渐降低。

虽然腺病毒可感染细胞的类别相当丰富，但是在上皮细胞中的转染效率最好。需要注意的是腺病毒颗粒进入宿主细胞很大程度上依赖于识别宿主细胞的表面受体，如柯萨奇病毒受体（coxsackie virus receptor，CVR）。这一类受体在成熟的平滑肌细胞、气管上皮细胞、淋巴细胞、纤维细胞、巨噬细胞和单核细胞源性的树突状细胞中几乎不表达。在大多数肿瘤细胞，如胶质瘤、骨髓瘤、胆囊癌细胞中表达水平也很低。因此，对于这些 CVR 表达水平低的宿主细胞，腺病毒转染效率相对较低（20%～40%），逆转录病毒载体当为首选。另外，MHC-Ⅰ类分子和某些整合素分子也可以作为腺病毒受体或辅助受体，参与腺病毒进入宿主细胞。

目前常用的腺病毒系统简单介绍如下。

1. Ad-Easy 系统

该系统是在 1998 年发明的，用来代替传统腺病毒重组系统。该系统属于 Ad5 型载体，采用 CMV 启动子以及 SV40 polyA 终止信号，包含 pAdEasy-1 以及 4 种穿梭质粒，可以插入 5.2～7.5kb 的片段。其中 pShuttle-IRES-hrGFP-1 和 pShuttle-IRES-hrGFP-2 含有 IRES，提供双顺反子表达元件，可以同时表达目的基因和 EGFP 报道基因，而且该穿梭质粒还提供 Flag 和 HA 蛋白标签以供选择。基本方法是将克隆了外源基因的腺病毒穿梭质粒转化至携带有腺病毒大部分基因组质粒（pAdEasy-1）的细菌，在大肠杆菌中完成外源基因插入腺病毒基因组的过程，获得环状的重组腺病毒基因组。经抗性筛选、扩增、提取质粒、酶切纯化后，转染 AD-293 细胞，在其中包装成重组病

毒颗粒。此方法的特点是重组过程在细菌内完成，操作相对简单，且同源重组率在60%以上，效率较高，因而得到了较广泛的应用。缺点是：要用能表达 RecA 重组酶的特定的大肠杆菌；由于重组是在细菌中发生的，微小的基因组变化不易发现；要获得高品质的重组腺病毒毒种（高病毒产量、高目的基因表达）需要挑选多个重组腺病毒质粒，分别转染 AD-293 细胞，获得多个重组病毒来筛选。Stratagene 等公司可以提供该系统。

2. AdMax 系统

该系统是在 2000 年构建的，是目前包装效率最高的方法。它的工作原理又回到了双质粒共转染方法，但与早期的方法不同的是，在转染时利用了重组酶系统(Cre-loxP)，极大地提高了重组效率。这个系统的优越之处还在于用它获得的重组腺病毒产量比较高。重组过程发生在 293 细胞中，从而避免在细菌中重组。将克隆了外源基因的腺病毒穿梭质粒与携带了腺病毒大部分基因组的包装质粒共转染 293 细胞，利用 Cre/loxP系统的作用实现重组，产生重组腺病毒。这个系统有多种优势，包括操作简便、重组效率高、获得的病毒产率高（一般大于 10^4 病毒颗粒/个细胞）、目的基因的表达水平高等。AdMax 系统由于需要空斑纯化，相对来说比较复杂。而且在 293 细胞中重组的策略也存在假阳性问题，造成在实际应用中筛选阳性克隆的时间较长。

3. Adeno-X 系统

Adeno-X 系统采用体外直接连接方案（而非同源重组策略），属于 Ad5 型载体。体外连接方法减少了非重组腺病毒的产生，且无须进行费时的空斑纯化，因此构建过程简单、方便，表达效率较高。而且宿主细胞范围广泛，在多种物种内均可表达，宿主细胞类型也多样，包括皮肤、肌肉、骨、神经、肝等细胞以及人淋巴瘤细胞等。实际操作中，由于需要将目的片段与约 30kb 的大质粒做连接，对于克隆经验很少的实验者来说，有些困难。另外，相较于其他系统来说，病毒滴度相对较低。Clontech 等公司提供该系统。

（二）腺相关病毒表达载体

腺相关病毒（AAV）属微小病毒科，是目前已知动物病毒载体中最简单的线状单链 DNA 病毒，基因组大小为 4.7～6kb，无包膜，病毒体为二十面体。AAV 是天然复制缺陷型病毒，需要腺病毒或单纯疱疹病毒辅助感染。目前广泛应用的腺相关病毒载体主要基于Ⅱ型腺相关病毒（AAV2)。AAV2 基因组有 4680 个核苷酸，含有 3 个启动子 P5、P19、P40，两个开放式阅读框 rep 、cap，以及位于基因组两端的末端反向重复序列 ITR。AAV 载体的最显著特点是可以整合入基因组，可以持续表达，而且被公认为是最安全的病毒载体。AAV 的缺点主要是外源基因容量小，制备较复杂，难于大量生产，滴度也相对不高，并需要去除辅助病毒的污染。目前，AAV 载体主要应用于基因治疗领域，在免疫学研究中应用较少，因此不做重点介绍。

（三）逆转录病毒表达载体

逆转录病毒（RV）是一种 RNA 病毒，基因组大小为 8～11kb。逆转录病毒经宿主

细胞表面的受体蛋白识别后进入细胞，然后在自身基因组编码的逆转录酶的作用下，以基因组 RNA 为模板逆转录出双链 DNA。双链 DNA 能够随机整合到宿主细胞的染色体上，随着宿主细胞的复制而复制。这类载体主要来源于莫洛尼（Moloney）鼠白血病病毒（murine leukemia virus，MMLV）。MMLV 基因组由 3 个结构基因 *gag*、*pol* 和 *env* 构成，两侧有长末端重复序列（long terminal repeat，LTR）。去除 LTR 及包装信号序列外的所有基因，并插入治疗基因、启动子和抗性基因，构建成重组病毒载体，包装病毒所需的结构蛋白则由辅助病毒提供。逆转录病毒是应用最早、研究相当热门的病毒载体，目前仍被广泛应用，逆转录病毒载体更适用于体外转染。

逆转录病毒载体具有以下优点：①宿主细胞广泛，能够感染多种类型细胞，包括皮肤上皮细胞、成肌细胞、肝细胞、血管内皮细胞以及几乎所有的免疫细胞等；②能高效地感染分裂细胞，感染率高达 100%；③外源基因能够完全整合到宿主细胞染色体上，并可以持久表达目的基因。

逆转录病毒载体也有明显的不足，主要表现在以下几个方面：①不能感染非分裂的细胞（如造血干细胞和胚胎干细胞等），但在病毒的基质蛋白基因中引入一个核定位信号序列后，病毒能穿透靶细胞核，也可用于转染不分裂细胞；②载体的整合是随机的，靶基因表达受插入位点两侧的宿主 DNA 序列影响，并可导致插入突变，从而引起癌变；③包装外源 DNA 能力有限，一般小于 8kb ；④要求靶细胞表面要具有逆转录病毒的相应受体，靶向性差；⑤有辅助病毒的作用，可能产生具有复制能力的病毒；⑥病毒滴度低，不易纯化。

目前常用的逆转录病毒系统简单介绍如下几种。

1. ViraPort 系列载体

Stratagene 公司的 ViraPort 逆转录病毒系统是一种产品多样的基因表达系统，在大多数分裂细胞内转导效率极高。使用该系统具有以下优点：可以整合入宿主基因组稳定表达；在高感染复数（multiplicity of infection，MOI）时，转导效率>90%；可以通过控制病毒滴度控制每个宿主细胞内的拷贝数目；可以应用于哺乳动物 cDNA 文库的功能筛选；该系统提供多种制备好的病毒载体 cDNA 文库。该系统包含多种载体，以 pFB 和 pFB-Neo 为代表，来源于 MMLV，含有氨苄青霉素筛选位点，便于细菌内扩增。其中 pFB-Neo 还含有来自于脑心肌炎病毒（EMCV）的 IRES 序列，可以同时表达新霉素抗性基因，可以应用于宿主细胞的稳定筛选。该公司还提供带有荧光素酶报道基因的病毒载体，用于鉴定基因表达和包装细胞筛选。

2. Retro-X 等系列载体

CLontech 公司的 Retro-X 系统提供了一种有效地制备有感染能力的复制缺陷的逆转录病毒表达载体的工具，来源于 MMLV，可以应用于几乎所有的分裂期细胞（包括原代细胞），可以应用于体内和体外的基因表达。pLNCX2 和 pLXSN 载体是 Retro-X 系统的基本载体。该系统载体多采用 CMV 启动子，特征性地表达抗生素抗性基因（新霉素、嘌呤霉素和潮霉素等），可以用于稳定筛选。另外，Retro-X 系统还提供四环素诱导表达载体以及带有荧光蛋白标记的载体，用以表达一些特殊的免疫分子和检测表达

效率。该公司还生产小鼠干细胞病毒（murine stem cell virus，MSCV）表达载体，用于干细胞的转染，含有3种抗生素标记，适合在人和小鼠造血干细胞和胚胎瘤细胞内稳定表达外源基因。该公司生产的泛嗜性（pantropic）逆转录病毒表达载体可以用于转染哺乳动物细胞和非哺乳动物细胞，而且病毒滴度可达 10^9 CFU/ml。

3. 其他逆转录病毒载体

如Cell Biolabs公司的逆转录表达载体种类较多，根据其基本载体骨架分为pBABE、pMCs、pMXs、pMYx等，带有不同筛选标记（潮霉素、新霉素、嘌呤霉素、抗稻菌素等）以及报道基因（如GFP）。大多逆转录病毒载体都是基于MMLV，这种逆转录病毒载体在一些非成熟细胞里面被沉默表达，如胚胎瘤细胞、胚胎干细胞和造血干细胞，因此适应面受到限制。而骨髓瘤病毒（MPSV）和PCC4细胞来源的骨髓瘤病毒（PCMV）是MMLV的变种，能很好地在上述非成熟细胞内稳定表达。

（四）慢病毒表达载体

慢病毒（LV）属于逆转录病毒家族的一个亚类。包括：灵长类病毒，如人类免疫缺陷病毒Ⅰ型（HIV-Ⅰ）、HIV-Ⅱ、猴免疫缺陷病毒（STV），以及非灵长类病毒，如羊进行性间质肺炎病毒（MVV）、猫免疫缺陷病毒（FIV）、马传染性贫血病毒（ELAV）、牛免疫缺陷病毒（RIV）等。其中最令人关注的是以HIV-Ⅰ为基础构建的慢病毒载体。HIV具有逆转录病毒的3个基因（*gag*、*pol* 和 *env*），此外还有6种辅助蛋白基因（*tet*、*rev*、*vpr*、*vpu*、*nef* 和 *vif*）。HIV病毒载体缺失病毒的结构蛋白基因（*gag*、*pol*、*env*）用于插入外源基因，而病毒的结构蛋白由辅助病毒提供，并可将病毒的env蛋白替换成VSV-G或MMLV的env蛋白，增加慢病毒感染宿主细胞的范围。另外为了进一步提高载体的安全性，还可将病毒的调控基因 *vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef* 去除掉。慢病毒能稳定整合入宿主染色体，因此能稳定高效地表达外源基因。慢病毒有着复杂的基因组，因其基因组中N端基质具有核定位信号序列，它能够有效感染并整合到非分裂细胞和终末分化的细胞（除 G_0 期），如造血干细胞、胚胎干细胞、神经细胞、视网膜感光细胞、肌肉细胞、肝细胞和巨噬细胞等。与简单的逆转录病毒相比，LV具有可感染分裂细胞及非分裂细胞、转移基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发免疫反应等优点。但慢病毒用作基因治疗载体有毒力恢复、垂直感染等安全问题。在免疫学研究中，慢病毒转染细胞的多样性是其最大的优势。

目前常用的几种慢病毒系统简单介绍如下。

1. ViraPower 慢病毒系统

Invitrogen公司的该系列载体的成员主要包括pLenti6/V5-D-TOPO、pLenti4/V5-DEST、pLenti6/V5-DEST、pLenti6.2/V5-DEST、pLenti6.2/C-Lumio™/V5-DEST、pLenti6.2/N-Lumio™/V5-DEST和pLenti6/UbC/V5-DEST等载体，应用于制备HIV-I为基础的复制缺陷型慢病毒，在293FT细胞内包装。该系统有以下优点：宿主细胞的选择较MMLV为基础的逆转录表达载体更宽；可以应用于体内和体外外源基因

的导入；以 VSV-G 作为包膜蛋白，以 CMV 和 RSV 启动子来调节目的基因表达；可以使用博莱霉素（zeocin）和抗稻菌素在哺乳动物细胞进行筛选，达到长期稳定表达外源基因的目的；载体安全性较好。

2. Lenti-X 系列载体

Clontech 公司的 Lenti-X 系统与 Invitrogen 的 pLenti 类似，都包含 ψ 包装信号和 LTR，以及 WPRE 和 cPPT 两个元件。其中 WPRE 来自于土拨鼠肝炎病毒，能加强基因的表达；cPPT 来自于 HIV 的整合酶基因，能够使慢病毒在宿主细胞内基因拷贝数倍增，增加病毒滴度；这两个元件一起可以使目的基因的表达水平增加近 4 倍。该系列载体还包括荧光表达载体，提供 N 端和 C 端融合绿色（AcGFP1）和红色（DsRed）荧光蛋白，方便观测蛋白质的表达和转运。另外，使用该系列载体还可以实现目的基因的四环素诱导表达。

3. ViraSafe 慢病毒表达系统

Cell BioLabs 的新一代慢病毒表达系统对广泛应用的第三代慢病毒进行了改进，将 Rev 与 *gag* 和 *pol* 基因分离，安全性更高。可以瞬时表达目的蛋白或用抗生素筛选稳定细胞株。与目前市场上流行的新一代慢病毒相比，ViraSafe 慢病毒表达系统进行了进一步的优化，采用 EF-1α 真核启动子，并且带有真核筛选标志（如新霉素和潮霉素）。在载体质粒上插入了 cPPT 及 WPRE 以增加病毒滴度，同时在整个系统载体的多个部分做了一些基因的优化、删减或插入以增加病毒的安全性。ViraSafe 表达系统的包装容量增大到了 10kb，其感染细胞的滴度及外源基因的表达水平均得以提高，降低了载体间的同源率和重组概率，使用更安全。

几种病毒表达系统在免疫学研究中均有较广泛的应用，因此在使用时需要细细地甄别和选择。表 18-4 列举了几种病毒表达载体的优缺点，以供参考。

表 18-4　常见病毒表达载体的特点和比较

参数	病毒载体类别			
	腺病毒	腺相关病毒	逆转录病毒	慢病毒
生物学性状	双链 DNA 病毒	单链 DNA 病毒	单链 RNA 病毒	单链 RNA 病毒
基因组大小	约 36kb	4.7～6kb	8～11kb	约 10kb
载体容量	5～7kb	约 5kb	约 8kb	约 8kb
特点	1. 比较安全 2. 可感染分裂或静息细胞 3. 不整合到宿主染色体中，致癌危险小 4. 表达水平较高 5. 病毒滴度高，易制备纯化 6. 瞬时表达	1. 安全性高 2. 可感染分裂或静息细胞 3. 整合到宿主染色体中，致癌危险小 4. 持续稳定表达	1. 宿主细胞广泛 2. 能感染分裂细胞 3. 整合到宿主染色体中，致癌危险性较大 4. 持久表达 5. 表达水平高	1. 宿主细胞广泛 2. 可感染分裂或静息细胞 3. 整合到宿主染色体中，致癌危险性较大 4. 持久表达 5. 表达水平高

续表

参数	病毒载体类别			
	腺病毒	腺相关病毒	逆转录病毒	慢病毒
缺点	1. 缺乏特异性 2. 不能持续表达 3. 重组困难 4. 免疫原性较强	1. 外源基因容量小 2. 制备较复杂 3. 滴度不高	1. 不能感染静息细胞 2. 靶向性差 3. 病毒滴度低	1. 病毒滴度低 2. 靶向性较差
免疫学应用	体外用于感染巨噬细胞、DC、B细胞等，效率较低。体内局部感染	应用较少	除造血祖细胞等静息细胞外，体外可感染大多数免疫细胞，效率高。也可以在动物模型中使用	体外可感染大多数免疫细胞，也可以在动物模型中使用
商用载体	Ad-Easy、AdMax 及 Adeno-X 等		ViraPort、Retro-X、pB-ABE、pMCs、pMYs 等	pLenti 系列、Lenti-X 系列、ViraSafe 系列等

总之，病毒载体由于其高容量，高转化率以及良好的靶向性，目前已在基础科研和临床基因治疗中得到广泛运用。在基础科研中主要是作为基因转移工具，将所研究的目的基因导入宿主细胞以观测目的基因的作用。临床中可用于基因治疗，包括遗传病基因治疗（如重症联合免疫缺陷综合征）、肿瘤等。当然病毒载体也有其不足之处，如RV病毒不能感染非分裂细胞，也可导致插入位点突变而引起癌症，包装外源基因片段有限或有可能产生具有复制能力的病毒等；对于腺病毒而言，由于其感染细胞谱广而缺乏特异性，不能像RV一样整合到宿主基因组中，缺乏持续表达外源基因的能力等。因此，病毒载体的安全性、高效性、靶向性及特异性应需进一步改进。

第三节 基因克隆和表达实施实例

一、质粒载体的构建

质粒是进行分子免疫学实验研究的基础。无论是原核质粒表达载体、真核质粒表达载体还是病毒表达载体，其基本的载体构建过程都包括以质粒为基础的操作过程。质粒载体构建的方法可以归纳为分、切、接、转、筛。

“分”：设计目的片段引物（含限制酶酶切位点，必须是表达载体上有而目的片段上没有的酶切位点）。一般通过PCR的方法扩增出所需目的片段。

“切”：用限制酶酶切目的片段和相应的表达载体，在这个过程中目的片段在酶切后可以进行PCR回收，也可以进行胶回收；但是表达载体一定要进行胶回收，并先去磷酸化，这样一方面可以防止自连，另一方面也能提高连接效率。

“接”：使用T4 DNA连接酶或者使用高效连接酶（ligation high）连接。

“转”：将连接产物转化宿主菌。

“筛”：根据重组载体的筛选标志（如抗生素抗性基因等）作筛选，挑取单克隆，制

备质粒并进行鉴定。

下面，以人免疫分子小G蛋白Rab7b的克隆［以pGEM-3Zf(－)作为克隆载体］为例介绍质粒构建的基本过程和技术。

（一）Rab7b编码序列的寻找和确认

步骤

1）登陆NCBI主页（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/），搜索“Nucleotide”，关键词可以设定为“Homo Sapiens”（此为种属设定）、“Rab7b”（此为分子名称设定）、“mRNA”（此为核苷酸性质设定）。可以依据分子的其他特征加入其他的搜索关键词，如“complete”、“CDS”等。

2）获得Rab7b的登录号（NM _ 177403）以及相关的序列信息。重点关注“CDS”（编码序列，coding sequence）以及“Definition”（即基因的名称介绍）项目。其中CDS提供了该基因的起始密码和终止密码位置。

3）分析所得序列的限制酶酶切位点，目的是排除该序列内是否包含pGEM-3Zf(－)的多克隆位点（MCS）内的限制酶位点（如*Eco*RⅠ、*Kpn*Ⅰ、*Bam*HⅠ、*Hin*dⅢ等）。

（二）引物设计，PCR法扩增Rab7b的编码基因

材料与试剂

组织和细胞cDNA模板

PCR试剂盒

TAE电泳缓冲液

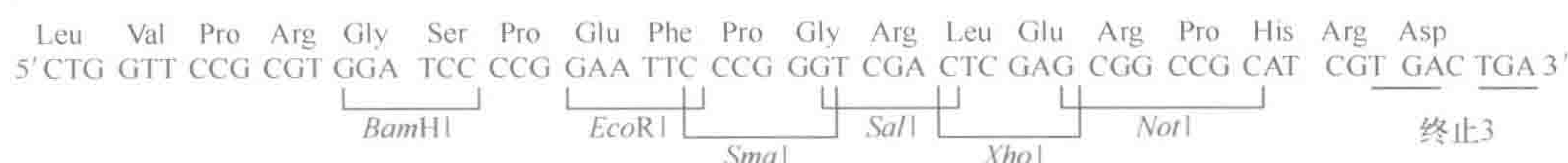
琼脂糖凝胶电泳仪

步骤

1）设计克隆引物。酶切位点的选择和克隆的目的是重点考虑的因素。例如，目的是利用pGEX-4T-1原核表达载体表达GST-Rab7b融合蛋白，那么引物设计就要满足表达载体pGEX-4T-1的可读框。可读框的信息可以从载体MCS的说明中得到。Rab7b的克隆引物设计可以选择*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ为两端的酶切位点（细节参见图18-1）。注意GST在N端，有自身起始密码子。

2）选择PCR模板。主要考虑目的基因的mRNA表达谱，包括文献中报道的Northern印迹结果和RT-PCR等，选择目的基因高表达的细胞系或者组织的cDNA。Rab7b的克隆可以选择人髓系来源的DC、THP-1、HL-60等细胞或细胞系cDNA作为模板来源。

3）PCR法扩增，琼脂糖凝胶（1.5%～2.0%）电泳鉴定。Rab7b的PCR产物应当为600bp左右。



Rab7b上游引物：5′GC GGA TCC atgaatccccggaagaaggtggacctg 3′

GC为方便酶切的补充碱基　*BamH* Ⅰ　Rab7b的编码序列其中，ATG密码子可以不要

Rab7b下游引物：

首先模拟Rab7b插入载体后的序列 5′GGATCC atg……ccagtcaaggagcagatgctgctga GAATTC 3′

BamH Ⅰ　Rab7b的编码序列　*EcoR* Ⅰ　引物区域

引物区域反向互补得到下游引物序列：5′GC GAATTC tcagcagcatctgctccttgactgg 3′

GC为方便酶切的补充碱基　*EcoR* Ⅰ　Rab7b的编码序列反向互补

图 18-1　依据原核表达载体 pGEX-4T-1 设计克隆引物的示意图

（三）PCR 产物和克隆载体的酶切、回收和连接

材料与试剂

pFEM-3Zf（一）克隆载体

PCR 产物回收试剂盒

胶回收试剂盒

限制酶

恒温水浴箱

T4 DNA 连接酶连接试剂盒

琼脂糖凝胶电泳仪

紫外分光光度计

步骤

1）PCR 产物纯化试剂盒回收 PCR 产物。

2）*Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ 酶切 PCR 产物和克隆载体［pGEM-3Zf(－)］。克隆载体还可以加磷酸酶去磷酸化，以提高克隆的阳性率。

3）琼脂糖凝胶电泳，分别胶回收 PCR 产物和克隆载体。

4）测定回收产物浓度，根据片段和载体大小，以适当比例混合，用 T4 DNA 连接酶行连接反应，16℃连接过夜。10μl 体积反应体系中，取载体 50～100ng，加入一定比例的外源 DNA 分子（一般线性载体 DNA 分子与外源 DNA 分子摩尔数为1∶1 到 1∶5）。

（四）克隆扩增及载体鉴定

材料与试剂

DH5α 感受态细菌
氨苄阳性 LB 平板
氨苄阳性 LB 培养基
细菌培养箱
细菌摇床
限制性内切核酸酶
琼脂糖凝胶电泳仪
DNA 测序仪
台式离心机

步骤

1）连接产物转化 DH5α 感受态细菌（感受态制备参见《分子克隆实验指南》）。

2）氨苄（50～100μg/ml）平板 37℃孵箱倒置培养过夜（8～12h）。

3）挑选阳性克隆（阴性的克隆不能长出），试管内加入含氨苄（50～100μg/ml）LB 培养基 2ml。37℃细菌摇床 180r/min 培养过夜（8～12h）。

4）细菌质粒小量制备。可以采用碱裂解法手动制备，也可以用质粒小提试剂盒制备。

5）质粒初步鉴定。如果所挑选克隆数量不多，则可以进行 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切，然后凝胶电泳鉴定，片段大小应为目的基因 Rab7b 的大小，约为 600bp。如果所挑选克隆数量较多，则可以利用 pGEM-3Zf(－）上下游的测序引物 T7/SP6 进行 PCR 鉴定。由于采用双酶切黏性末端连接，因此阳性率高，一般挑选 4～6 个克隆即可。

6）质粒测序鉴定。T7 或 Sp6 单向测序（因为 Rab7b 才 600bp），如果目的基因大于 800bp 则双向测序，如目的片段超过 2000bp 则需要自主设计引物以鉴定序列。这一步骤至关重要。最后用 DNA 序列分析软件（如 AlignX、DNAssist、Primer premier 等）比对测序结果。

7）保存序列完全正确的阳性克隆。既可以留存质粒，也可以将相应克隆的菌液加入等体积甘油，－80℃保存。

二、质粒载体的原核表达

原核细胞表达目的基因的目的往往是获得大量的蛋白质，因此可以使用一些蛋白标签来简化蛋白质纯化的步骤，如果不用标签，也可以通过其他的蛋白质纯化技术，如凝胶过滤法、离子交换法等。

以 GST-Rab7b 融合蛋白的表达载体的构建和融合蛋白表达、纯化为例来说明质粒载体的原核表达过程、步骤和技术。

（一）原核表达载体的构建

材料与试剂

包含 Rab7b 基因的 pGEM-3Zf（—）克隆载体
限制酶
琼脂糖凝胶电泳仪
胶回收试剂盒
紫外分光光度计
T4DNA 连接酶试剂盒
BL21 感受态细菌
氨苄阳性 LB 平板
氨苄阳性 LB 培养基
细菌培养箱
培养摇床
台式离心机
DNA 测序仪

步骤

1）将包含 Rab7b 基因的 pGEM-3Zf（—）克隆载体和 pGEX-4T-1 载体用 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切，分别胶回收 Rab7b 片段和 pGEX-4T-1 载体片段。
2）连接反应，16℃过夜。
3）转化 BL21 感受态细菌，氨苄抗性 LB 平板培养过夜。
4）挑选阳性克隆，试管内加入含氨苄（50～100μg/ml）LB 培养基 2ml。37℃细菌摇床 180r/min 培养过夜（8～12h）。
5）细菌质粒小量制备，行 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切，然后凝胶电泳鉴定。由于序列已经在克隆载体构建过程中测序鉴定，这里可以不再测序。
6）将鉴定阳性的克隆的菌液用接种环接种到氨苄阳性的新平板上（划板），克隆长出后，可以在 4℃保存平板 7～14d，方便后续的诱导表达。

注意事项

这里采用的是 BL21 感受态细菌，目的是方便和优化 GST 融合蛋白的表达和纯化，如果只是为了获得原核表达质粒，则 DH5α 感受态细菌也可以选择。

（二）GST 融合蛋白的小规模诱导表达

材料与试剂

阳性菌单克隆平板
分光光度计
氨苄阳性 LB 培养基
细菌摇床

台式离心机
微量离心管
IPTG
10%～12% SDS-PAGE 变性凝胶
SDS 蛋白质上样缓冲液
蛋白质电泳仪
考马斯亮蓝或银染染色体系
细胞超声粉碎仪
PBS

步骤

1）从新鲜的划线平板中挑取单克隆（1～10 个），接入 2ml 含有氨苄的 LB 中，37℃振摇培养至 OD_{600} 值达到 0.4～1.0（建议 OD_{600} 为 0.6，大约 5h 后可达到）。
2）从中取出一些样品（50～100μl）离心收集菌体，作为未诱导对照。
3）在剩下的样品中加入 100mmol/L IPTG 储液至终浓度 0.1～1.0mmol/L 继续培养 2～3h（各试管的 IPTG 浓度不同，诱导时间也不同，以确定适当的诱导时间和 IPTG 的浓度）。
4）将剩余菌液 4℃下 5000g 离心 5min 收集菌体。
5）用 500～1000μl PBS 重悬菌体，置于冰浴中进行超声粉碎至液体澄清。
6）台式离心机 4℃下 13 000g 离心 10min，分别收集上清和沉淀。
7）将各个样品，包括未诱导对照、诱导和超声粉碎后上清和沉淀，加入 SDS 上样缓冲液，煮沸 5min。
8）用 10%～12% SDS-PAGE 电泳，进行蛋白质的分离。
9）考马斯亮蓝染色或银染，观察目标蛋白的表达情况。
10）确认诱导条件以及目标蛋白的表达水平（高和低）和分布（上清还是沉淀）。

注意事项

1）在操作过程中要求无菌操作，蛋白质处理过程中要求低温。
2）如果目的蛋白表达水平较低，或者 GST 融合蛋白的分子质量与菌体内内源性蛋白分子质量接近，则可以采用 Western 印迹采用 GST 抗体来检测目的蛋白质的表达情况。
3）在确认诱导条件时，以上清中蛋白质的表达水平为最主要考察因素，甚至为了保证上清中蛋白质的表达可以牺牲部分全菌体表达水平的最佳条件。
4）如果目的蛋白出现在沉淀中，那么提示该融合蛋白的可溶性较差，以包含体的形式出现。这时可以进一步优化诱导条件，如在 OD_{600} 较低时 IPTG 诱导、降低 IPTG 的浓度、减少诱导时间、降低诱导温度（25～35℃）、补充葡萄糖等，以促进融合蛋白以可溶性形式出现。依然不能溶解，则采用包含体蛋白纯化技术来纯化蛋白质，或者更换载体系统重新来过。
5）在鉴定目标蛋白表达后，可以尝试小量蛋白质的纯化（Sepharose 4B 珠子沉淀

试验）以确定 GST 融合蛋白与 Sepharose 4B 珠子的亲和力。

（三）GST 融合蛋白的大规模诱导表达

材料与试剂

阳性菌菌液
分光光度计
氨苄阳性 LB 培养基
细菌摇床
台式离心机
细菌培养瓶
IPTG
10%～12% SDS-PAGE 变性凝胶
SDS 蛋白质上样缓冲液
蛋白质电泳仪
考马斯亮蓝或银染染色体系
细胞超声粉碎仪
PBS
细菌裂解液

步骤

1）从表达目的蛋白的菌液中取一接种环菌液，接种入 2ml 含有氨苄的 LB 中，37℃振摇培养 3～4h。
2）4℃下 5000*g* 离心 5min 收集菌体。
3）用 500ml 氨苄阳性 LB 重悬细菌［也可以直接将步骤 2）中菌液直接转接］，37℃振摇培养至达到适当 OD_{600} 值，为 0.4～1.0。
4）按照小量诱导的条件加入 IPTG 诱导适当的时间。
5）取少量菌液（约 1ml），菌体粉碎后分离上清和沉淀，蛋白质电泳鉴定融合蛋白质表达情况。
6）收集菌体，加入 PBS 或者细菌裂解液（50mmol/L Tris-HCl，2 mmol/L EDTA，0.1% Triton X-100，pH8.0）40～50ml。
7）冰浴条件下超声粉碎至液体澄清，13 000*g* 离心 15min，收集上清液。

（四）GST 融合蛋白的纯化

材料与试剂

Sepharose 4B 珠子
PBS
洗脱液（50mmol/L Tris-HCl，pH8.0，1～10mmol/L 还原型谷胱甘肽）
低温振荡器

离心管

步骤

1）制备 50% Sepharose 4B 悬液。取 2ml 购买的珠子，500*g* 离心 2min，去除上清，PBS 洗一次（500*g* 离心 2min，去除上清），加入 2.5～3ml PBS 制成 50% Sepharose 4B 悬液（每 1ml 珠子约加入 1.33ml PBS）。

2）将 Sepharose 4B 悬液 500～600μl 加入约 50ml 裂解上清中。

3）上下颠倒混匀，置入振荡器 4℃振荡 2～4h。

4）500*g* 离心 2min，去除上清。PBS 洗 3 遍，吸去 PBS。

5）加入 500μl 还原型谷胱甘肽洗脱液（浓度由低到高，可以增加融合蛋白的特异性洗脱机会），4℃振荡 10～30min。

6）500*g* 离心 2min，收集上清，取少量蛋白质电泳、考马斯亮蓝染色鉴定。

7）纯化所得蛋白质分装，－80℃保存。

注意事项

1）一般情况下，每 1mg 融合蛋白约需要 400μl 的 50% Sepharose 4B 悬液。

2）如果所得蛋白质浓度较低，可以经过超滤浓缩等方法浓缩蛋白质。

3）目前，已填装完全的亲和层析柱基本商业化，比珠子沉淀纯化更为方便。

4）融合蛋白的应用极为广泛，既可以进行酶活性分析（如对于 Rab7b 来讲可以检测其 GTP 结合活性以及其 GTPase 活性），也可以进行蛋白质相互作用的分析。

5）如果需要去除 GST 标签，则可以使用凝血酶 Xa 加入洗脱液，室温孵育 2h，蛋白质电泳检测切割效率，然后用凝胶过滤层析法获得无标签的蛋白质。

（五）GST 融合蛋白的包含体纯化

材料与试剂

缓冲液 A：50mmol/L Tris-HCl（pH8.0），2mmol/L EDTA，100mmol/L NaCl；

缓冲液 B：50mmol/L Tris-HCl（pH8.0），1mmol/L EDTA，100mmol/L NaCl，1% NP-40

缓冲液Ⅰ：50mmol/L Tris-HCl（pH8.0），2mmol/L EDTA，100mmol/L NaCl，0.5% Triton X-100（体积比），4mol/L 尿素

缓冲液Ⅱ：50mmol/L Tris-HCl（pH8.0），2mmol/L EDTA，100mmol/L NaCl，3% Triton X-100

缓冲液Ⅲ：50mmol/L Tris-HCl（pH8.0），2mmol/L EDTA，100mmol/L NaCl，0.5% Triton X-100，2mol/L 盐酸胍

缓冲液 C：8mol/L 尿素，10mmol/L β-巯基乙醇，100mmol/L Tris-HCl（pH8.0），2mmol/L EDTA

脱氧胆酸钠

步骤

1）用缓冲液 A 漂洗菌体细胞（10ml/g），6000*g* 离心 15min，收集菌体细胞，重复

此步骤，将菌体细胞再在缓冲液 A 中洗涤一次。

2）将漂洗过的菌体细胞悬浮于缓冲液 B 中，超声破碎，镜检，破碎率高于 95%，15 000g 离心 30min，收集包含体沉淀。

3）将包含体沉淀用缓冲液Ⅰ、缓冲液Ⅱ、缓冲液Ⅲ分别超声洗涤一次，15 000g 离心 30min 收集包含体沉淀。

4）包含体的溶解。用含 0.5%脱氧胆酸钠的缓冲液 C 重悬沉淀，室温放置 30min，然后 15 000g 离心 30min，留上清。将溶解后的蛋白质适当稀释，磁力搅拌，透析过夜。

5）溶解后的包含体蛋白可通过亲和层析进一步纯化。

三、质粒载体的真核表达

真核细胞表达目的基因的目的往往是研究基因的生物学或者免疫学的功能，包括其亚细胞定位和转位、对免疫细胞功能的影响、信号转导以及其与疾病的关系和在疾病的治疗中的应用等。

下面以 pcDNA3.1/His A 作为真核表达载体，以 pGEM-3Zf（—）作为克隆载体，以构建真核表达带标签（His 和 Xpress 标签）的人源 Rab7b（pcDNA3.1-Rab7b）为例说明真核质粒表达载体的构建、表达和鉴定。

克隆载体的构建过程在上面已有描述，但是由于 pcDNA3.1 载体与原核表达的 pGEX-4T-1 载体的酶切位点和可读框的差异，引物设计与前面所述略有差异。载体构建的策略有两种：①直接用含 Rab7b 基因的 pGEM-3Zf（—）克隆载体作为模板进行亚克隆，使其适应 pcDNA3.1 的可读框；②直接用细胞 cDNA 模板重复上述原核细胞的克隆载体的构建过程，再将片段连接入 pcDNA3.1 真核表达载体。

（一）真核表达载体 pcDNA3.1-Rab7b 的构建和鉴定

材料与试剂

包含 Rab7b 基因的 pGEM-3Zf（—）克隆载体
pcDNA3.1/His A 载体
PCR 试剂盒
限制性内切核酸酶
琼脂糖凝胶电泳仪
胶回收试剂盒
紫外分光光度计
T4 DNA 连接酶试剂盒
DH5α 感受态细菌
氨苄阳性 LB 平板
氨苄阳性 LB 培养基
细菌培养箱、培养摇床
台式离心机
DNA 测序仪

步骤

1）设计合成引物。由于需要携带 N 端的 His 和 Xpress 标签，所以依然可以选择 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ，但是 PCR 引物必须重新设计以完全适合 pcDNA3.1 载体的可读框（图 18-2）。

pcDNA3.1/His A MCS

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met
5′ATG GGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG
6×His标签

Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Val Pro Arg Ile Gln Cys Gly Gly Ile Leu Gln
GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GTA CCT AGG ATC CAG TGT GGT GGA ATT CTG CAG…TAG…3′
Xpress标签　*Kpn*Ⅰ　*Bam*HⅠ　*Eco*RⅠ　Stop

Rab7b上游引物：5′GC GGA TCC AG atgaatccccggaagaaggtggacctg 3′



Rab7b下游引物：
首先模拟Rab7b插入载体后的序列 5′GGATCC AG atg……ccagtcaaggagcagatgctgctga ATTC 3′
*Bam*HⅠ　引物区域　*Eco*RⅠ

引物区域反向互补得到下游引物序列：5′GC GAAT tcagcagcatctgctccttgactgg 3′
*Eco*RⅠ　Rab7b的编码序列反向互补
GC为方便酶切的补充碱基

图 18-2　依据真核表达载体 pcDNA3.1/His A 设计克隆引物的示意图

2）PCR 法扩增，琼脂糖凝胶（1.5%～2.0%）电泳鉴定。以克隆载体 pGEM-3Zf-Rab7b 为模板，Rab7b 的 PCR 产物应当为 600bp 左右。

3）PCR 产物纯化，*Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ酶切 PCR 产物和克隆载体［pGEM-3Zf（－）］。

4）分别胶回收 PCR 产物和克隆载体，进行连接反应。

5）连接产物转化 DH5α 感受态细菌，氨苄（50～100μg/ml）平板 37℃孵箱倒置培养过夜（8～12h）。

6）挑选阳性克隆，试管内加入含氨苄 LB 培养基 2ml。37℃细菌摇床 180r/min 培养过夜（8～12h）。

7）细菌质粒小量制备。*Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ酶切鉴定以及 T7 或 SP6 DNA 测序鉴定。

8）测序正确质粒以及 pcDNA3. 1/His A 表达载体 *Bam*H Ⅰ/*Eco*R Ⅰ 酶切，分别回收 Rab7b 片段和载体片段。

9）进行连接反应，转化细菌，挑选单克隆，质粒小量制备，酶切鉴定。

10）大量制备 pcDNA3. 1-Rab7b 表达质粒。

注意事项

1）由于重新进行了 PCR 克隆，所以克隆载体必须重新测序，以保证序列的准确性。

2）大量制备真核表达质粒时，最好使用无内毒素的质粒制备试剂盒以及无内毒素的吸管等耗材，而且为了转染等后续操作，可以根据导入外源 DNA 的方式选择 H_2O 或者 TE 溶液等适当溶液溶解质粒 DNA。

（二）真核表达载体 pcDNA3. 1-Rab7b 导入免疫细胞

可以采用多种外源基因导入的方法将 pcDNA3. 1-Rab7b 转染入各种免疫细胞，具体操作参见本章第四节相关介绍。

（三）真核表达载体 pcDNA3. 1-Rab7b 在免疫细胞内表达的鉴定

可以采用瞬时表达或者稳定表达的方式来表达目的蛋白。以瞬时表达为例并采用 Western 印迹方法等来介绍目的蛋白的表达和鉴定。

材料与试剂

细胞或细胞系

完全培养基

SDS 蛋白上样缓冲液

蛋白质电泳和蛋白质转印系统

TBST 缓冲液

抗 His 或 Xpress 抗体

酶标二抗

细胞裂解液（加入蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液）

步骤

1）瞬时转染（6 孔板）免疫细胞或者模型细胞，如 HEK293、CHO、COS-7 等。采用空白对照载体和 pcDNA3. 1-Rab7b 分别转染。

2）48h 后，吸除培养基，PBS 洗一遍，加入 200～300μl 细胞裂解液，冰浴 5min。

3）移液器吹打细胞，收集细胞裂解液。如极度黏稠，则可以进行超声粉碎使细胞完全裂解。

4）加入 SDS 上样缓冲液，煮沸 5min。

5）10%～12% SDS-PAGE 变性凝胶蛋白质电泳，使用抗 His 或 Xpress 抗体 Western 印迹检测融合蛋白表达。

注意事项

1) 真核表达蛋白的鉴定可以使用 Western 印迹检测蛋白质的表达，也可以使用 RT-PCR 方法检测 mRNA 的表达，可以与空白对照载体比较 PCR 产物的多少来确定其是否表达，也可以设计针对载体序列的引物来行 RT-PCR 检测。
2) 除了 Western 印迹和 PCR 外，其他的方法也可以应用于蛋白质的检测。如果表达的是分泌型免疫分子（如细胞因子和趋化因子等），可以使用 ELISA 法检测目的基因表达水平；如果表达的免疫分子是细胞膜型分子，则可以使用 FACS 分析技术来鉴定。
3) 由于 His 和 Xpress 不易观察，因此可以采用共转染报道基因（如 EGFP 载体和荧光素酶载体）的方法来初步分析转染和表达的效率。

（四）真核表达载体 pcDNA3.1-Rab7b 在模型细胞内的稳定筛选

如果真核表达的目的是大量制备蛋白质，则最好使用带有蛋白标签（便于纯化）和真核筛选标志（便于稳定筛选）的载体。pcDNA3.1/His A 载体带有新霉素抗性基因，可以用 G418 进行压力筛选，以大量扩增表达目的基因的真核细胞。以 CHO 细胞为例来说明稳定筛选和大量扩增的技术和方法。

材料与试剂

CHO 细胞
DMEM/F12 完全培养基
G418 溶液
SDS 蛋白质上样缓冲液
HEPES
TBST 缓冲液
抗 His 或 Xpress 抗体
酶标二抗
细胞裂解液（加入蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液）
蛋白质电泳和蛋白质转印系统

步骤

1) 瞬时转染（6 孔板）CHO 细胞。采用空白对照载体和 pcDNA3.1-Rab7b 分别转染。
2) 转染 48h 后，加入适当浓度的 G418（终浓度为 600～800μg/ml）。配制 G418：1g G418 溶于 1ml 1mol/L 的 HEPES 溶液中，加蒸馏水至 10ml，过滤消毒，−20℃保存。确定 G418 的最佳浓度的具体流程：稀释细胞到 1000 个细胞/ml，每孔 100μl 加入 24 孔板。在 100μg/ml～1mg/ml 的 G418 浓度范围内进行筛选，以 10～14d 内使细胞全部死亡的最低 G418 浓度为基准，筛选时浓度可再高一级别。

3）继续培养 7～10d。

4）将细胞胰酶消化后，在 96 孔板中进行单克隆化，用含 G418（可以减半用量）的培养基继续培养扩增。

5）细胞增殖满以后，转移到 6 孔板继续筛选和培养。

6）取部分细胞鉴定目的基因 mRNA 和蛋白质的表达，筛选出高表达目的基因的细胞克隆，部分细胞冻存。

7）放大培养体系，扩增高表达目的基因的细胞克隆。

注意事项

1）这里采用了单克隆细胞的筛选和扩增，是为了蛋白质的纯化做准备。但是在基础研究过程中，细胞经过药物压力筛选后，可以不单克隆化，直接应用于功能分析。

2）在细胞大量增殖过程中会出现真核载体拷贝的丢失，因此及时冻存高表达的细胞克隆是非常必要的。

（五）融合蛋白的纯化

根据蛋白标签的特点可以采用不同的蛋白质纯化方法。基本步骤是裂解细胞，收集上清，用亲和层析（如蛋白质 A 标签）或金属螯合层析（如 His 标签）等方法纯化蛋白质。具体操作参见相关文献。

四、病毒载体的表达

虽然腺病毒、逆转录病毒和慢病毒等载体系统的构建原理不完全相同，但是病毒载体的表达过程一般是：构建穿梭质粒→细菌或细胞内重组→包装细胞内包装病毒颗粒→病毒鉴定→纯化病毒→病毒滴度确定→感染靶细胞。所使用到的技术和方法较类似，因此本章以 Ad-Easy 腺病毒系统制备表达小鼠 E3 泛素连接酶 Nrdp1 的腺病毒载体为例来说明病毒表达载体的构建、包装、纯化的步骤、方法和注意事项。Ad-Easy 腺病毒的构建基本过程如表 18-5 所示。

表 18-5　Ad-Easy 腺病毒载体系统基因克隆和表达的基本过程

主要步骤	主要操作
克隆目的基因	1. PCR 扩增目的基因
	2. PCR 产物和穿梭质粒的酶切、回收
	3. 将目的基因连接入 pShuttle 穿梭质粒，转化细菌，筛选克隆
	4. 带目的基因的穿梭质粒测序鉴定
细菌内同源重组	1. 穿梭质粒 *Pme* Ⅰ的线性化
	2. 线性化穿梭质粒与 pAdEasy-1 质粒共转化 BJ5183 菌株
	3. 质粒制备、酶切鉴定，获得重组质粒
	4. XL10-Gold 菌株内扩增并大量制备

续表

主要步骤	主要操作
AD-293 细胞内病毒包装	1. 重组质粒 *Pac* Ⅰ的线性化 2. 转染 AD-293 细胞 3. 收集细胞，反复冻融，获得病毒原始储存液 4. 病毒载体的鉴定，是否表达目的蛋白 5. AD-293 细胞内大量扩增病素 6. 病毒的纯化 7. 病毒滴度测定
表达和纯化目的蛋白	1. 腺病毒感染靶细胞 2. 鉴定目的蛋白表达 3. 蛋白质的纯化

（一）克隆目的基因，制备穿梭质粒

材料与试剂

小鼠脑
脾脏或心脏 cDNA 模板
pShuttle-IRES-hrGFP-1 穿梭载体
PCR 试剂盒
限制性内切核酸酶
琼脂糖凝胶电泳仪
胶回收试剂盒
紫外分光光度计
T4 DNA 连接酶试剂盒
DH5α 感受态细菌
卡那阳性 LB 平板
卡那阳性 LB 培养基
细菌培养箱
培养摇床
台式离心机
DNA 测序仪

步骤

1）设计合成引物。由于需要携带 C 端的 Flag 标签，所以 PCR 产物必须携带起始密码子（ATG），而且不能携带终止密码子。Nrdp1 的 GenBank 登录号为 BC049078，编码区含有 *Xho* Ⅰ酶切位点，参照 pShuttle-IRES-hrGFP-1 穿梭载体的多克隆位点（MCS），选择的酶切位点为 *Eco*RⅤ和 *Sal* Ⅰ（图 18-3）。

2）PCR 扩增 Nrdp1。以 Nrdp1 表达阳性的小鼠脑、脾脏或心脏 cDNA 模板进行 PCR 扩增。

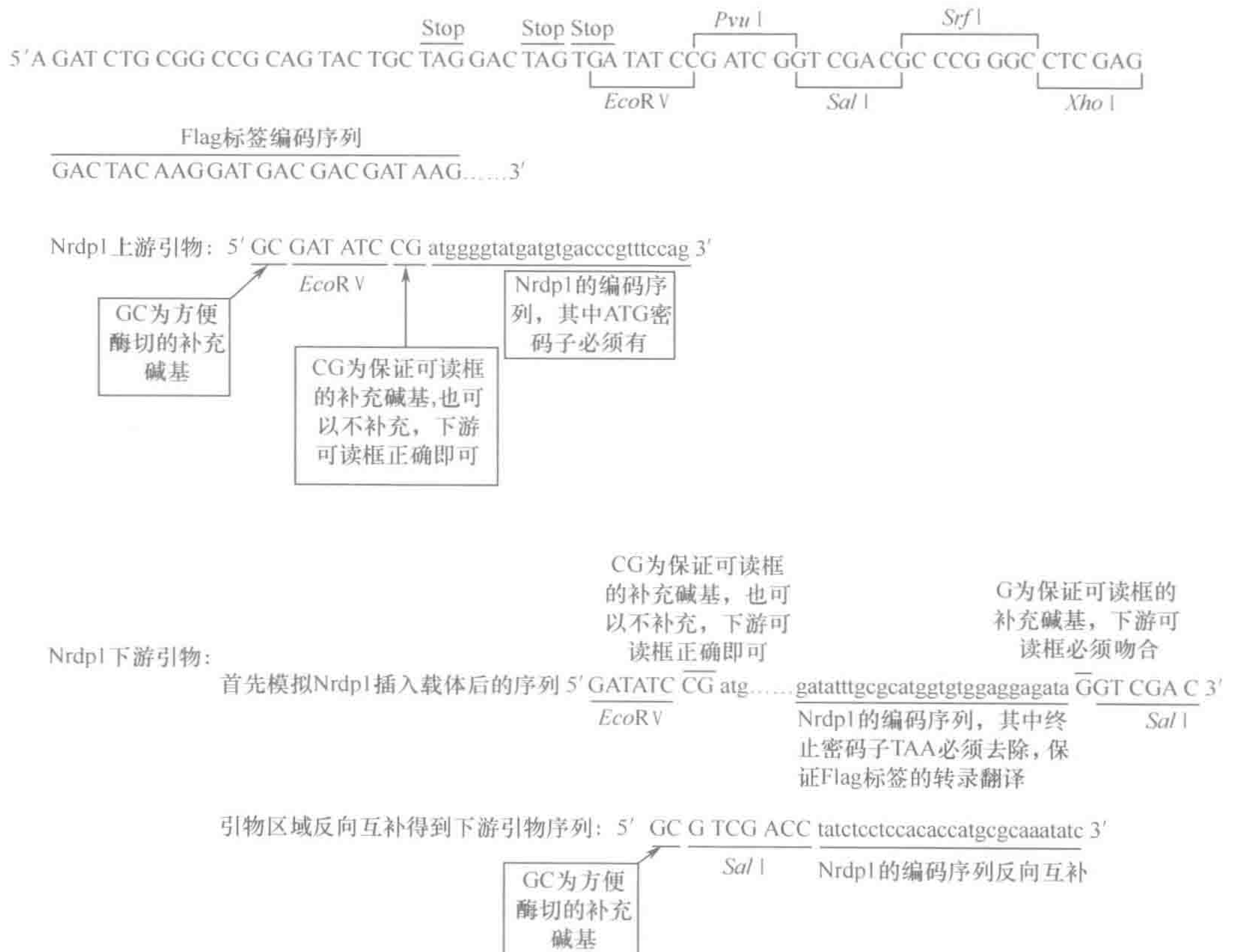


图 18-3　依据穿梭质粒 pShuttle-IRES-hrGFP-1 设计克隆引物的示意图

3）PCR 产物纯化，*Eco*R Ⅴ 和 *Sal* Ⅰ 酶切 PCR 产物和 pShuttle-IRES-hrGFP-1 载体。

4）分别胶回收 PCR 产物和克隆载体，进行连接反应。

5）连接产物转化 DH5α 感受态细菌，卡那（50μg/ml）平板 37℃孵箱倒置培养过夜（8～12h）。

6）挑选阳性克隆，试管内加入含卡那的 LB 培养基 2ml。37℃细菌摇床 180r/min 培养过夜（8～12 h）。

7）细菌质粒小量制备。*Eco*R Ⅴ 和 *Sal* Ⅰ 酶切鉴定以及 DNA 测序（该系统提供相应的测序引物）鉴定。

8）大量制备包含目的基因的穿梭载体（pShuttle-Nrdp1-Flag-hrGFP）。

注意事项

1）要使用 Ad-Easy 系统，目的基因内必须不包含 *Pac* Ⅰ 和 *Pme* Ⅰ 酶切位点，因为这两种酶应用于后续的重组过程中的 DNA 线性化。

2）这里使用的感受态是 DH5α，其他的菌株也可以使用，但必须是能够扩增

pBR322 复制起始子的菌株。

3）也可以采用其他克隆载体，然后通过酶切、连接、质粒制备鉴定的过程获得 pShuttle-Nrdp1-Flag-hrGFP 穿梭质粒载体。

4）上游引物设计时，最好使其中包含 Kozak 序列。

（二）转化 BJ5183 菌株，制备腺病毒重组质粒

材料与试剂

BJ5183 菌株，pShuttle-Nrdp1-Flag-hrGFP 穿梭质粒，pAd-Easy-1 载体，限制性内切核酸酶，电穿孔仪，细胞电击杯（electroporation cuvette，电极距离 0.2cm），琼脂糖凝胶电泳仪，胶回收试剂盒，紫外分光光度计，卡那阳性或氨苄阳性 LB 平板，卡那阳性 LB 培养基，细菌培养箱，培养细菌摇床，台式离心机，质粒小提和大量制备试剂盒

步骤

1）pShuttle-Nrdp1-Flag-hrGFP 穿梭质粒的线性化（linearization）。按照每个转化反应需要 2μg 线性化载体片段来进行线性化单酶切反应。限制酶使用的是 *Pme* Ⅰ，酶切完成后需要碱性磷酸酶去磷酸化。同时使用 pShuttle-CMV-lacZ 对照载体进行线性化和去磷酸化，借以判断线性化是否完全。

2）琼脂糖凝胶电泳，充分分离酶切所得片段，胶回收完全切开的载体片段，溶于无菌 H_2O（浓度为 1μg/μl）。

3）取 4 个细胞电击杯，置于冰上预冷。－80℃取出 BJ5183 菌株，置于冰上解冻。

4）每个微量离心管（无 DNA 酶）加入 40μl 菌体，然后每管分别加入①1μg 线性化并去磷酸化的 pShuttle-Nrdp1-Flag-hrGFP 穿梭质粒载体片段和 100ng pAdEasy-1 质粒载体；②1μg 线性化并去磷酸化的 pShuttle-CMV-LacZ 载体片段和 100ng pAdEasy-1 质粒载体；③1μg 线性化并去磷酸化的 pShuttle-IRES-hrGFP-1 载体片段；④0.01ng pUC18 对照质粒。轻弹管壁混匀。转入细胞电击杯。

5）设置电击条件（200Ω、2.5kV、25μF），将电击杯放入电穿孔仪。

6）电脉冲一次，立即拿出电击杯，加入 1ml LB 培养基，移液器轻轻混匀。

7）转移入微量离心管，225～250r/min 37℃摇菌 1h。

8）每种转化细胞（除 pUC18 外）分别取 50μl、100μl、250μl 和 600μl 菌液均匀铺于卡那阳性 LB 平板。pUC18 对照质粒取 5μl 菌液加入 100μl LB，然后铺于氨苄阳性 LB 平板。

9）细菌培养箱倒置平板，37℃培养过夜。

10）挑选阳性克隆。参照 pUC18 平板确定转化效率，参照其他对照确定菌落的正常大小，成功重组的菌落应该是微小的（大约为对照菌落的 1/3 大小）。除了目的基因的重组克隆外，同时挑选 pShuttle-CMV-LacZ 的重组克隆。

11）最后挑选 10 个或更多的最小的菌落，加入 2～3ml 卡那阳性的 LB 培养基，

225～250r/min 37℃培养过夜。

12）质粒小量制备，溶于 50μl 无菌水或 TE 溶液。

13）质粒酶切鉴定。用 *Pac* Ⅰ限制酶酶切 10μl 重组质粒 pAd-Nrdp1-Flag-hrGFP，同时采用的对照有：①未酶切的重组质粒（Nrdp1 的重组质粒，即小量制备的未鉴定质粒 pAd-Nrdp1-Flag-hrGFP）；②*Pac* Ⅰ酶切的穿梭质粒（pShuttle-Nrdp1-Flag-hrGFP）；③pShuttle-CMV-LacZ 重组的质粒（pAd-LacZ）。

14）0.8%的琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下鉴定片段大小。阳性克隆应当出现约 30kb 的大片段以及 3.0kb 或 4.5kb 的小片段。未酶切的重组质粒会在凝胶上端的靠近胶孔的位置出现 DNA 拖尾现象。*Pac* Ⅰ酶切的穿梭质粒 pShuttle-Nrdp1-Flag-hrGFP 会出现约 7kb 和 3kb 的片段各一条。重组的质粒 pAd-LacZ 可以作为阳性对照（约 30kb 的大片段以及 3.0kb 或 4.5kb 的小片段）。通常由于质粒制备的过程中可能会出现 BJ5183 DNA 本底污染，因此建议多用几个克隆以在高效转化效率的 XL10-Gold 菌株中大量质粒制备后重新鉴定一次。

注意事项

1）实验过程中对照的设置有比较严格的要求，包括 BJ5183 的电穿孔转化以及 *Pac* Ⅰ酶切鉴定的步骤，便于分析实验失败的原因以及便于阳性重组质粒的鉴定。但是，如果经验丰富、试验条件稳定，则不需要这么多对照，但是最好使用 LacZ 相关的对照质粒。

2）BJ5183 的转化能力是细菌内病毒质粒重组的关键因素，因此必须确认其转化效率，而且电穿孔的条件可以进一步优化，使用 pUC18 对照质粒可以完成这两个关键条件的确认和优化。

（三）使用 XL10-Glod 菌株大量制备重组质粒

材料与试剂

XL10-Gold 菌株

NZY^+肉汤：10g 酸水解酪蛋白，5g 酵母提取物，5g NaCl，加去离子水至 1L，用 NaOH 调 pH 至 7.5，灭菌备用，用前加入 12.5ml 1mol/L $MgCl_2$，12.5ml 1mol/L $MgSO_4$，20ml 20%（质量体积比）葡萄糖（或 10ml 2mol/L 葡萄糖）pAd-Nrdp1-Flag-hrGFP 重组质粒

限制性内切酶 *Pac* Ⅰ

琼脂糖凝胶电泳仪

卡那阳性或氨苄阳性 LB 平板

卡那阳性 LB 培养基

细菌培养箱

培养摇床

台式离心机

质粒小提和大量制备试剂盒

步骤

1）在冰上预冷 14ml BD Falcon 聚丙烯圆底离心管（因为后续加入的β-巯基乙醇对其他材料有损害，影响转化效率）。一支用作转化 pUC18 对照质粒，其他的用于转化重组质粒克隆（鉴定阳性的多个重组克隆，包括不能完全肯定的可疑重组克隆）。同时将 NZY^+ 肉汤培养基在 42℃预热。

2）冰上融化 XL10-Gold 细胞。融化时轻轻将细胞混匀并分装成 100μl/管。

3）每管中加入随试剂盒提供的 4μl β-巯基乙醇。温和混匀后将细胞在冰上放置 10min，每 2min 轻轻混匀一次。

4）每管细胞加入 0.1～50ng 重组质粒 pAd-Nrdp1-Flag-hrGFP，其中一管加入 0.01ng 对照 pUC18 质粒，然后轻轻混匀，冰上放置 30min。

5）试管在 42℃水浴 30s，然后立即冰浴 2min。

6）每管加入 0.9ml 预热（42℃）的 NZY^+ 肉汤，37℃、225～250r/min 摇床培养 1h。

7）每管分别取 5μl、25μl、100μl 的转化混合物铺在卡那阳性 LB 琼脂糖平板上。取 5μl pUC18 对照质粒的转化混合物稀释于 195μl 的 NZY^+ 肉汤中，然后铺于氨苄阳性 LB 琼脂糖平板上。

8）倒置平板，37℃培养过夜。

9）每种重组质粒的平板挑选 1～2 个克隆，加入 10ml 卡那阳性 LB 培养基，37℃、225～250r/min 摇床培养过夜（8～12h）。

10）取 5ml 菌液暂时 4℃冻存，其余 5ml 菌液用于质粒小量制备。

11）将小量制备的质粒进行 *Pac* Ⅰ 酶切鉴定（0.8%琼脂糖凝胶），确认阳性重组克隆（应当出现约 30kb 的大片段以及 3.0kb 或 4.5kb 的小片段），若仍然出现其他条带，则弃用该克隆。

12）将 4℃冻存菌液接种入 500ml 的卡那阳性 LB 培养基中，37℃、225～250r/min 摇床培养过夜。

13）质粒大量制备获得重组质粒（可以用 CsCl 密度梯度离心或者标准的大提试剂盒），−20℃保存备用。

注意事项

1）进行转化试验时，最好多选几个 BJ5183 来源的质粒克隆，以方便在 XL10-Gold 菌株中进行重新鉴定。

2）由于加入了β-巯基乙醇以提高转化效率，转化所用离心管的材质必须是聚丙烯，以防离心管损伤释放其他毒性物质影响转化菌。

3）超级感受态细胞对微小的温度改变也极度敏感，因此必须存放在−80℃冰箱的底部。即使是将细胞从一个冰箱转移到另一个冰箱也会导致转化效率的损失。

4）用 NZY^+ 培养基菌落生长最好，用其他培养基替代往往会造成转化效率降低。

5）转化连接产物时，每 100μl 细胞要求 2μl 连接反应产物，DNA 溶液的体积可以增至总转化体系体积的 10%，但是转化效率也相应降低。

6）最优的转化条件是采用 42℃热激 30s。热激<30s 或>40s 均造成效率降低，而且温度不可超过 42℃。

（四）重组质粒的线性化和 AD-293 细胞包装腺病毒

材料与试剂

大量制备的 pAd-Nrdp1-Flag-hrGFP 重组质粒，限制性内切酶 *Pac*Ⅰ，AD-293 细胞，DMEM 完全培养基，转染试剂，PBS，琼脂糖凝胶电泳仪，DNA 纯化试剂盒，光学显微镜或者荧光显微镜，台式离心机，细胞培养箱，旋口离心管，干冰/甲醇浴，水浴箱

步骤

1）用 *Pac*Ⅰ酶切足量的大量制备的 pAd-Nrdp1-Flag-hrGFP 重组质粒（每个转化反应约需要 5μg 线性化 DNA）。

2）取 0.2μg 酶切产物，用 0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切是否完全。其余的酶切产物用 DNA 纯化试剂盒纯化，溶于无菌水，－20℃保存备用。

3）转染前 24h 将 7×10^5～8×10^5 个 AD-293 细胞铺于 60mm 培养皿中。待细胞扩增至 50%～70%融合度后，开始转染试验。

4）按照说明书利用 Ad-Easy 系统所提供转染试剂盒进行转染，也可以使用其他 DNA 转染试剂按照说明书进行转染。

5）细胞培养箱 37℃培养 7～10d。当培养基颜色变黄时，可以根据细胞状况补充培养基。具体是若细胞贴壁良好，则可以吸去培养基后加入 4ml（60mm 培养皿）新鲜培养基；若细胞有脱离培养皿悬浮于培养基中时，则可以加入等量（4ml）新鲜培养基。待细胞出现细胞病变效应（cytopathic effect，CPE）时，准备收集病毒。CPE 主要是在光镜下观察到的细胞形态学改变，具体的表现是细胞肿胀变圆，核相对变大，折光增强，细胞呈葡萄串状排列等。使用 GFP 标签时，可以采用荧光显微镜观察 GFP 的表达情况。

6）收取培养基，500*g* 离心 3min，收集培养基中细胞；另外用 0.5ml（60mm 培养皿）PBS 将贴壁细胞洗一次，再加入 0.5ml PBS 后用细胞刮收集细胞。合并培养基中悬浮的细胞以及收集的贴壁细胞，置于旋口离心管中。

7）准备干冰/甲醇浴（将干冰放入甲醇溶液中至干冰不再溶解，温度约为－78.6℃）和 37℃水浴。

8）将收集的细胞（于 0.5ml PBS 溶液中）进行 4 轮冻融。每一轮分别在干冰/甲醇浴和 37℃水浴中至少 5min，每次 37℃水浴后需要漩涡振荡。

9）室温下 12 000*g* 离心 10min，收集上清（即为原始病毒），－80℃保存备用。

10）取少部分原始病毒感染 AD-293 细胞或者其他靶细胞，培养 48h 左右，采用 Western 印迹、PCR 等方法检测目的基因的表达情况。

注意事项

1）AD-293 细胞是改良的 HEK293 细胞，其贴壁能力增加，适宜病毒包装和扩增，实际上任何能够表达 E1 的细胞均可以考虑用作该腺病毒的包装细胞。

2）线性化重组质粒转染293细胞可以采用试剂盒中的试剂，也可以采用其他的适当的转染试剂。

3）病毒包装的成功有几个关键决定因素，如AD-293细胞的状态（传代少，小于30代，贴壁和增殖能力良好）、转染时不可太满（<50%～60%）、适时加入新鲜培养基、CPE的判定、冻融的效果等。

4）冻融时干冰/甲醇浴可以用－80℃冰箱替代。

5）如果细胞培养的技能熟练，则可以延长病毒包装时间，改用直接收集培养基。

6）在所有的细胞操作和后续的病毒收集、冻融过程中必须保持无菌操作。

7）按照上述方法获得的病毒，滴度为10^8～10^9PFU/ml，但是不同的批次和不同的载体滴度会有差异，可以通过特定方法测定病毒滴度。

8）注意在将线性化重组质粒加入AD-293细胞后即认为该培养体系内存在了腺病毒，需要使用病毒操作相关的枪头和其他特殊保护装备，而且所使用过的耗材均需要病毒消毒处理后才能丢弃。

（五）腺病毒的扩增和纯化

材料与试剂

原始病毒储存液
AD-293细胞
DMEM完全培养基
PBS
CsCl
光学显微镜或者荧光显微镜
台式离心机
细胞培养箱
旋口离心管
干冰/甲醇浴
水浴箱
超速离心机
超速离心管
透析袋
透析液（10mmol/L Tris pH 8.0，2mmol/L $MgCl_2$，5%蔗糖）

步骤

1）在100mm培养皿或75cm^2培养瓶中加入10ml完全培养基，AD-293细胞数目大约为5×10^6个，培养至50%～70%细胞融合度。

2）取适量原始病毒储存液（一般为1～5μl）用培养基稀释到1ml。

3）吸去培养瓶或者培养皿中培养基，加入病毒稀释液1ml，“十”字形慢慢晃动3次混匀，37℃ CO_2孵箱中培养90min。

4）加入 9ml 完全培养基，继续培养 3～4d。

5）收集细胞，重复冻融操作以裂解细胞，收集病毒裂解上清（第一代病毒）。

6）CsCl 密度梯度离心纯化腺病毒。若需纯化病毒，则需要约 3×10^8 个细胞包装的病毒，需要 20～40 个 100mm 培养皿或 $75cm^2$ 培养瓶包装的病毒。20ml 超速离心管中缓慢加入 8ml 的 1.4g/ml CsCl（10mmol/L Tris-HCl，pH 7.9），上面小心加入 6ml 的 1.2g/ml CsCl（10mmol/L Tris-HCl，pH7.9），再小心加入病毒裂解上清至体积达到 20ml。平衡后，4℃下 23 000r/min 离心 90min（SW28 转头），用注射器抽吸下层蓝白色病毒带。

7）病毒透析去盐。配置透析液，灭菌处理。4℃透析，更换 3 次透析液，可基本去除 CsCl，病毒保存于－80℃。

注意事项

1）氯化铯密度梯度离心法至今仍是分离纯化各种病毒的最常用方法，由于操作具有一定的复杂性，而且 CsCl 有一定毒性，因此可以使用商业化的腺病毒纯化试剂盒来进行。

2）需要注意的是，每次病毒扩增后，可以使病毒滴度大约增加 10 倍。但是不可以重复无限制扩增传代病毒（一般小于 3～4 代），目的是为了防止腺病毒在 AD-293 细胞内与细胞基因组重组产生具有复制能力的腺病毒（replication-competent adenovirus），因此最好每次都使用原始病毒储存液。要排除该可能，可以使用非包装细胞（如 A549），通过空斑形成实验（必须小于 $1/10^4$）来鉴定是否形成了具有复制能力的腺病毒。

（六）腺病毒滴度测定

材料与试剂

AD-293 细胞
DMEM 完全培养基
待测病毒
低熔点琼脂糖
细胞培养箱

步骤

1）以 5×10^5 个/孔的密度将 AD-293 细胞铺于 6 孔板，37℃培养过夜。

2）取适量病毒储存液用培养基稀释到 1ml，采用 10 倍倍比稀释的方法，终稀释范围为 10^{-5}～10^{-9}。

3）吸去培养基，加入病毒稀释液 1ml，留 1 或 2 孔仅加入培养基作为阴性对照。"十"字形慢慢晃动 3 次混匀，37℃ CO_2 孵箱中培养 90～120min。注意每种稀释度需要 2 或 3 个复孔。

4）用 PBS 配置 5%琼脂糖，高温灭菌（可以储存到 4℃，使用时煮沸融化即可，避免每次都高温灭菌）。放置到约 45℃水浴中使温度降低，然后加入 3 倍体积

预热（37℃）的完全培养基，轻摇混匀（终浓度为 1.25%琼脂糖）。

5）吸去病毒稀释液，取 3ml 1.25%琼脂糖混合液沿板壁加入 6 孔板中，37℃ CO_2 孵箱中培养 12～21d。若培养过程中培养基变黄则可以补入 1.5ml 的琼脂糖混合液。

6）待出现白色小点（蚀斑或称空斑）并清晰可数后，进行蚀斑计数，并计算复孔的平均值。

7）计算病毒滴度。PFU/ml＝蚀斑数×稀释倍数。如在 10 000 倍稀释条件下的蚀斑数为 40 个，则所制备的病毒的滴度为 4×10^5 PFU/ml。

注意事项

1）蚀斑形成实验可以很好地测定病毒滴度，而且代表的是具有感染能力的病毒的滴度，因此应用广泛。

2）还可以采用终末稀释法（end-point dilution assay）来进行具有感染能力的病毒滴度的估算，即使用 96 孔板病毒稀释 10^{-3}～10^{-10} 倍，然后用公式进行计算。若是测定纯化后的病毒滴度，则可以酌情采用 OD_{260} 来进行测定，获得的是光学颗粒单位（optical particle unit），而不是 PFU。

3）腺病毒载体完成包装纯化后，也可以感染蛋白质表达系统所使用的工具细胞进行蛋白质的表达和纯化，如 CHO 细胞。其特点是表达水平高但是不能持续表达。与真核载体的蛋白质表达和纯化类似，腺病毒所表达蛋白质的纯化可以利用腺病毒载体所带的标签（如 HA、Flag 等）采用特定方法（如亲和层系、金属螯合层析等）来进行。

4）腺病毒载体的构建和包装、纯化等过程可以代表其他病毒载体的基本克隆和表达的过程，因此关于逆转录病毒载体和慢病毒载体的构建、包装、纯化，本章不做赘述。在这些基本的操作过程中可能会遇到一些问题，但是随着经验的积累和商业化载体系统的进步，病毒载体的构建和获得过程将大大简化，这些将促进病毒载体的应用范围逐渐扩大，尤其是在免疫学的体外细胞感染和体内模型建立中将发挥更加重要的作用。

第四节　外源基因的导入

虽然表达系统和表达载体多种多样，但是在基因克隆和表达的过程中均需要将外源的 DNA 导入宿主细胞。外源基因导入细胞的方法根据宿主和载体的不同有很大的差异。如果将 *E. coli* 等原核细胞用作宿主细胞，则外源 DNA 导入的方法主要是制备感受态细菌，再利用热激等方法来进行，或者直接采用电穿孔导入外源 DNA。如果是真核细胞中的酵母细胞，则外源 DNA 导入的方式与细菌类似。由于细菌和酵母的细胞结构相对简单而稳定，因此外源 DNA 导入的多种方式均可以达到高效简便的目的，而且这两种宿主细胞均可以进行单克隆的药物或者颜色筛选，容易得到阳性克隆，达成实验目的。但是其他的真核细胞，如昆虫细胞和哺乳动物细胞，外源 DNA 导入则相对复杂，

容易受到多种因素的限制。真核载体中的病毒载体可以依靠病毒颗粒自身与靶细胞的细胞膜相互识别而自主进入靶细胞，因此相对简单高效。但是，真核载体中的质粒载体导入哺乳动物细胞则需要借助于各种物理、化学的方法，实现导入外源基因并表达外源基因的目的。因此，本章重点介绍真核质粒载体导入哺乳动物细胞的方法和相关技术。

将外源基因导入宿主细胞，又称基因转染（transFection），是将具有生物功能的核酸转移或运送到细胞内并使核酸在细胞内维持其生物功能。其中，核酸包括 DNA（质粒和线性双链 DNA）、反义寡核苷酸及干扰 RNA（siRNA 或 RNAi）。基因转染技术已广泛应用于基因组功能研究（基因表达调控、基因功能、信号转导和药物筛选研究）和基因治疗研究。在免疫学研究中，通常基因转染有两类：一类是将目的基因转入体外培养的细胞；另一类是将基因转入从体内取出的细胞中，观察目的基因在细胞中表达。体外培养的细胞可以是已建立的细胞系（株），包括二倍体正常细胞；体内细胞如淋巴细胞、LAK 细胞、TIL 细胞等，可以在基因转入后再回输体内，用于基因治疗。通常所说的基因转染主要是指将真核质粒载体携带的 DNA 导入哺乳动物细胞的过程。

常规转染技术可分为两大类：一类是瞬时转染，另一类是稳定转染（永久转染）。瞬时转染时外源 DNA/RNA 不整合到宿主染色体中，因此一个宿主细胞中可存在多个拷贝数，产生高水平的表达，但通常只持续几天，多用于启动子和其他调控元件的分析。一般来说，超螺旋质粒 DNA 转染效率较高，在转染后 24～72h 内分析结果，常常用到一些报告系统，如荧光蛋白、β-半乳糖苷酶等来帮助检测。稳定转染时外源 DNA 既可以整合到宿主染色体中，也可能作为一种游离体（episome）存在。尽管线性 DNA 比超螺旋 DNA 转入量低，但其整合率较高。外源 DNA 整合到染色体中概率很小，大约$1/10^4$的转染细胞能整合，通常需要通过一些选择性标记反复筛选，得到稳定转染的同源细胞系。

一、常用基因转染技术

常见的基因转染技术主要有磷酸钙-DNA 共沉淀法、DEAE-葡聚糖法、脂质体法、电穿孔法、基因枪法等，但是目前最常用的方法主要是脂质体法和电穿孔法，其中脂质体法主要应用于贴壁细胞（株）的转染，而电穿孔法主要应用于悬浮细胞（包括原代免疫细胞）。

（一）磷酸钙-DNA 共沉淀法

当核酸以磷酸钙-DNA 共沉淀物的形式出现时，可使 DNA 附在细胞表面，以利于细胞吞入摄取，或通过细胞膜脂相收缩时裂开的空隙进入细胞内。进入细胞的 DNA 仅有 1%～5%可以进入细胞核中，其中仅有不到 1%的 DNA 可以与细胞 DNA 整合，在细胞中进行稳定表达，基因转导的频率大约为 10^{-4}，这项技术能用于任何 DNA 导入哺乳类动物进行瞬时表达或稳定表达的研究。此方法对于贴壁细胞转染是比较常用的方法之一。沉淀物的大小和质量对于磷酸钙介导转染的成功至关重要。一般说来，DNA 的总浓度会显著地影响细胞对 DNA 的捕获效率。在实验中使用的每种试剂都必须小心校准，保证质量，因为甚至偏离最优条件 1/10 个 pH 都会导致磷酸钙转染的失败。但该

方法重复性较差，实验条件要求较苛刻，不能有效转染原代细胞和悬浮细胞等，应用范围比较有限。

（二）DEAE-葡聚糖法

DEAE-葡聚糖介导的转染，其原理可能是带正电的DEAE-葡聚糖与核酸带负电的磷酸骨架相互作用形成的复合物被细胞内吞。其方法是先制备出葡聚糖混合液，加入目的基因混合后转染宿主细胞。该方法转染效率较高，但不适用于分离获得稳定的转染细胞。DEAE-葡聚糖用于克隆基因的瞬时表达，不能使细胞稳定转染，它对COS等细胞系非常有效，但对其他类型的细胞转染效果不太理想。DEAE-葡聚糖转染所用DNA量较磷酸钙法少，DNA量增多反而会抑制转染。转染效率与DEAE-葡聚糖浓度以及细胞与DNA/DEAE-葡聚糖混合液接触时间的长短有很大关系，可采用较高浓度的DEAE-葡聚糖（1g/L）作用较短时间（30min～1.5h），也可用较低浓度（250mg/L）的DEAE-葡聚糖作用较长时间（8h）。利用促进剂（如DMSO、氯喹、甘油、聚乙胺）或其他增加细胞渗透性、促进内吞作用的物质处理细胞，DEAE介导的瞬时转染效率可提高约50倍。但对于具体的细胞、具体的培养条件，如需获得更加理想的转染效率，必须自行摸索优化转染方法。由于DEAE介导的转染方法可以转染贴壁细胞，也可以转染悬浮细胞，因此目前在免疫学研究中该方法还有比较多的应用，如DEAE-Dextran（如Sigma公司）介导的DC和T细胞转染。

（三）脂质体法

脂质体是由天然脂类和类固醇组成的微球，根据其结构所包含的双层膜层数可分为单室脂质体和多室脂质体。脂质体转染法可能的机制是阳离子脂质体与带负电的基因借静电作用形成脂质体基因复合物，此复合物因阳离子脂质体的过剩正电荷而带正电，借助静电作用吸附于带负电的细胞表面，再通过与细胞膜融合或细胞内吞作用而进入细胞内。脂质体/DNA复合物在细胞质中可能进一步传递到细胞核内释放基因，并在细胞内获得表达。脂质体介导的基因转移包括两个步骤，首先是脂质体与DNA形成复合物，然后介导与细胞的作用，将DNA释放到细胞中。脂质体作为基因转移载体具有以下优点：易于制备，使用方便，不需要特殊的仪器设备；无毒或低毒；与生物膜有较大的相似性和相容性，可生物降解；目的基因容量大，可将DNA特异性传递到靶细胞中，使外源基因在体外细胞中有效表达。但脂质体法也存在不足，如基因表达量较低，持续时间较短，稳定性欠佳。脂质体转染所需的DNA用量与磷酸钙法相比大为减少，而转染效率却高5～100倍，具有广谱、高效、快速转染的特点。随着脂质体技术的进步，可以通过一些化学修饰改善脂质体的存在时间、靶向性、转染效率等参数，如PEG修饰、单克隆抗体修饰、蛋白质和多肽修饰（如TAT多肽修饰）、糖基修饰（如甘露糖）等。目前，很多的公司均可以提供脂质体转染试剂，如Invitrogen的Lipofactamine 2000、Promega公司的TransFast、Bio-Rad公司的TransFectin、Sigma公司的DOTAP、Roche公司提供的FuGene系列等。

（四）电穿孔法

电穿孔（electroporation）是指在高压脉冲的作用下使细胞膜上出现微小的孔洞，从而导致不同细胞之间的原生质膜发生融合作用的细胞生物学过程。同时，电穿孔可促使细胞吸收外界环境中的DNA分子。在高压电场的作用下，细胞膜因发生临时破裂所形成的微孔，可使大分子及小分子从外界进入细胞内部，或反向流出细胞。细胞膜上微孔的关闭是一种衰减过程，此过程在0℃下会被延缓进行。微孔开启时，细胞外的DNA分子便穿孔而入，最终进入细胞核内部。该方法的主要特点是操作简便、持续时间短、转染效率高。影响电穿孔转染效率和细胞存活效率的主要因素是脉冲的最大电压、电容、持续时间，电转液的温度与组成，DNA浓度，所用的细胞类型与数量。因此当转染不同细胞时须进行个别优化，最后得到最佳的转染条件。电穿孔法的缺点主要是需要专门的仪器和附件，而且对细胞的损伤较大，甚至可以引起大于50%的细胞死亡。由于免疫细胞大多数为悬浮的细胞，而且免疫学研究中经常使用到原代分离纯化的细胞，因此电穿孔法具有相当大的应用范围；但是当细胞来源稀有时，如流失分选所得免疫细胞，电穿孔法不是首选。随着技术的进步，电穿孔法已经得到了改进，出现了专门的为某种细胞类型特意优化的实验方案，如Amaxa公司提供的Nucleofector转染仪器及相关试剂，为转染原代T细胞、B细胞、免疫细胞系（如K562、JURKAT或白血病细胞如CLL或AML等细胞）以及单核细胞、巨噬细胞或郎格罕氏细胞、CD34阳性细胞、树突状细胞等建立了成熟的实验方案。

（五）基因枪法

基因枪技术，又称微粒子轰击技术（particle bombardment）或者生物溶解颗粒技术（biolistic particle），是通过提供给包裹有DNA的微小金颗粒（或钨粉）很高的初速度，使其穿透细胞壁而达到转移外源质粒DNA的目的。由于纯金没有化学活性，不会对机体产生毒性，所以这项技术后来被用到哺乳动物类实验系统中。用基因枪已经把报道基因和功能基因成功地转入了各种培养细胞中和各种活体组织中。基因枪技术作为转移基因的一种方式，具有以下优点：技术简单，能够迅速、方便地转移基因；对靶细胞几乎没有要求；对基因的大小要求不严格，大大拓宽了可转移基因的范围；容易获得高水平的多基因共转移；安全性很高；可以获得持续时间较长的瞬时表达。一般用金或钨制作的粒子将DNA导入细胞。钨粒子大小不规则，对某些细胞有毒性，而且易于氧化，容易导致DNA降解。金的毒性较小，延展性好，易于制备适当直径的规则粒子。但与钨相比，金与DNA结合率低，而且费用较贵。这项技术被广泛应用于哺乳动物实验研究，其体外转染效率达5.3%～33.3%。目前商业开发可用的两个主要产品是Accell基因枪（Agracetus公司）和Helios基因枪（BioRad实验室）。

（六）其他

除上述传统方法外，近年来国际上推出了一些阳离子聚合物基因转染技术，以其适用宿主范围广、操作简便、对细胞毒性小、转染效率高受到研究者们的青睐。其中树枝

状聚合物（dendrimer）和聚乙烯亚胺（polyethylenimine，PEI）的转染性能最佳，但树枝状聚合物的结构不易于进一步改进，且其合成工艺复杂。聚乙烯亚胺是一种具有较高的阳离子电荷密度的有机大分子，使聚合物网络在任何 pH 下都能充当有效的"质子海绵"（proton sponge）体。这种聚阳离子能将各种报道基因转入各种种属细胞，效果好于脂质聚酰胺，其转染性能普遍好于树枝状聚合物，而且它的细胞毒性低。大量实验证明，PEI 是非常有希望的基因治疗输送平台。目前在设计更复杂的基因载体时，PEI 经常作为核心组成成分。GenEscort 是采用各种分枝状和超高分枝状的小分子 PEI 与各种含有生理条件下可降解键的交联剂交联，合成出的一系列高分枝的可降解的 PEI 衍生物。聚合物的分枝结构使得 GenEscort 具有较高的正电性，因此易于高效地包裹各种 DNA、RNA 分子及质粒形成小的纳米颗粒，从而提高转染效率。当所形成复合物进入细胞以后，其中所含的生理条件下可降解的化学键在细胞内水解，使交联聚合物分解为无细胞毒性的小分子 PEI，这样结构的转染试剂在体外应用可以获得高的转染效率和低的细胞毒性，其可降解性对体内应用也具有重要的意义。代表性的商业化产品如 Polyplus 公司提供的相关阳离子聚合物 JetPEI 线性聚乙烯亚胺衍生物、Novagen 公司开发的 NanoJuice 树枝状聚合物转染试剂盒等。

上述的基因转染方法大都适用于细胞体外的基因导入，其中脂质体法、电穿孔法还常用于介导体内的基因导入。现有的转染技术都或多或少地有各种不足，其中转染效率低、细胞毒性高是研究者最常遇到的困扰。而许多细胞系，特别是原代细胞，很难获得理想的转染效果。现有的转染试剂产品在应用中还有一个普遍的问题，就是不太可能采用单一一种试剂在各种细胞上都获得较高转染效率。因此研究者不得不尝试很多种类的转染试剂而获得特定细胞的最佳转染效果。因此，在实际操作中基因转染的方法需要仔细选择，同一类型的转染试剂也需要仔细甄别。

二、基因转染方法的选择

选择真核质粒载体的基因转染方法需要重点考虑以下因素。

1. 细胞的类型

其中贴壁细胞适合选择除电穿孔法以外的其他方法，悬浮细胞则可以选择除基因枪法和磷酸钙-DNA 共沉淀法外的其他方法。

2. 体内转染还是体外转染

体外的研究上述方法均可以考虑，体内的研究一般不选择基因枪法，因为其容易损伤组织细胞。另外，细胞毒性大（如 DEAE-葡聚糖法）、转染效率相对较低（磷酸钙-DNA 共沉淀法）的转染方法也需要酌情考虑不予选用。

3. 转染效率

一般情况下转染效率较高的方法依次为电穿孔、基因枪、树枝状聚合物或阳离子聚合物、脂质体、DEAE-葡聚糖、磷酸钙-DNA 共沉淀法。

4. 细胞毒性

细胞毒性大小依次为电穿孔、基因枪、磷酸钙-DNA 共沉淀、DEAE-葡聚糖、脂质

体、树枝状聚合物或阳离子聚合物。

5. 价格和仪器品配

一般情况下基因转染的耗费和仪器的要求由高到低依次为基因枪、电穿孔、脂质体、树枝状聚合物或阳离子聚合物、DEAE-葡聚糖、磷酸钙-DNA 共沉淀。

实际的应用中应该综合考虑各种因素，其中转染效率是重点考虑因素。目前适合大多数免疫细胞选用的转染方法根据使用频率依次为电穿孔、脂质体、树枝状聚合物或阳离子聚合物、DEAE-葡聚糖，磷酸钙-DNA 共沉淀法和基因枪法使用频率较少。

转染效率是设计基因转染试验时需要重点考虑的因素，转染效率受多种因素影响，主要因素有以下几种。

（一）转染试剂

不同细胞系转染效率不同，但细胞系的选择通常是根据实验的需要，因此在转染实验前应根据实验要求和细胞特性选择适合的转染试剂。每种转染试剂都会提供一些已经成功转染的细胞株列表和文献，通过这些资料可选择最适合实验设计的转染试剂。当然，最适合的是高效、低毒、方便、廉价的转染试剂。

（二）转染方法

不同转染试剂有不同的转染方法，但大多大同小异。转染时应按照具体转染试剂推荐的方法操作，但也要注意，因不同实验室培养的细胞性质不同、质粒定量差异、操作手法上的差异等，其转染效果可能不同，应根据实验室的具体条件来确定最佳转染条件。

（三）细胞培养

1. 细胞状态

一般低的细胞代数（小于 50 代）能确保基因型不变。最适合转染的细胞是经过几次传代后达到指数生长期的细胞，细胞生长旺盛，最容易转染。细胞培养在实验室中保存数月和数年后会经历突变、染色体重组或基因调控变化等而演化，这会导致细胞行为的变化。也就是说，同一种系的细胞株，在各实验室不同培养条件下，其生物学性状发生不同程度的改变，导致其转染特性也发生变化。因此，如果发现转染效率降低，可以试着转染新鲜培养的细胞以恢复最佳结果。

2. 细胞培养基

健康的细胞是成功转染的基础。不同细胞有不同的培养基、血清和添加物。高的转染效率需要一定的细胞密度，一般的转染试剂都会有专门的说明。一般推荐在转染前 24h 准备细胞，这将提供正常细胞代谢，增加对外源 DNA 摄入的可能。一定要避免细菌、支原体或真菌的污染。

3. 细胞密度

细胞密度对转染效率有一定的影响。不同的转染试剂，要求转染时的最适细胞密度

各不相同，即使同一种试剂，也会因不同的细胞类型或应用而异。转染时过高或者过低的细胞密度会导致转染效率降低，乃至表达水平偏低。因此如果选用新的细胞系或者新的转染试剂，最好能够进行优化实验并为以后的实验建立一个稳定方法，包括适当的接种量和培养时间等。尽量在细胞最适的生理状态下转染，以求最佳的转染效果。不同的实验目的也会影响转染时的铺板密度，如研究细胞周期相关基因等表达周期长的基因，就需要较低的铺板密度，所以需要选择能够在较低铺板密度下进行转染的试剂。一般转染时贴壁细胞密度为50%～90%融合度，需要参考所选转染试剂的说明书。

4. 血清

血清一度曾被认为会降低转染效率，老一代的转染方法往往要求转染前后洗细胞或者在无血清培养基条件下转染，但有些对此敏感的细胞如原代细胞会受到损伤甚至死亡，导致转染效率极低。不过转染产品配方几经革新后的今天，对于主流的转染试剂来说，血清的存在已经不会影响转染效率，甚至还有助于提高转染效率，如阳离子聚合物等。血清的存在会影响DNA-转染复合物的形成，但在转染过程中是可以使用血清的，只要在DNA-转染复合物形成时用无血清培养基或PBS来稀释DNA和转染试剂就可以了。

5. 抗生素

细胞培养过程中往往会添加抗生素来防止污染，但是这些添加剂可能对转染造成麻烦。青霉素和链霉素就是影响转染的培养基添加物。这些抗生素一般对真核细胞无毒，但有些转染试剂增加了细胞的通透性，使抗生素可以进入细胞。这可能间接导致细胞死亡，造成转染效率低。目前转染试剂因为全程都可以用有血清和抗生素等添加剂的完全培养基来操作，非常方便，省去了污染等麻烦。

（四）DNA质量

DNA质量对转染效率影响非常大。一般的转染技术（如脂质体等）基于电荷吸引原理，如果DNA不纯，如带少量的盐离子、蛋白质或代谢物污染都会显著影响转染复合物的有效形成及转染的进行。因此，目的基因的载体纯化时应该考虑可能的转染方法，采用适当的DNA纯化试剂盒。

（五）N/P（氮磷比）

氮磷比是影响转染效率的关键因素之一（为了换算方便，一般以DNA/转染试剂质量比表示），在一定比例范围内转染效率随氮磷比成比例增高，之后达到平值，但毒性也随之而增加，因此在实验之前应根据推荐比例，确定实验的最佳转染比例。

三、基因转染实施实例

综合转染效率和价格等因素，下面简单介绍常用的磷酸钙-DNA共沉淀法、DEAE-葡聚糖法、电穿孔法、脂质体法和聚乙烯亚胺（PEI）法的实施和操作。切记，没有任

何转染方法适合所有细胞，也没有任何一种转染步骤方法一成不变，即使使用同一种转染试剂转染同一种细胞，也需要不断优化得到最好的转染效果。

(一) 磷酸钙-DNA 共沉淀法

材料与试剂

呈指数生长的 HEK293 细胞

完全培养液

纯化的质粒 DNA：0.5～2μg/μl，无蛋白质无酚

2×HEPES 缓冲液：50mmol/L HEPES，280mmol/L NaCl，10mmol/L KCl，1.5mmol/L 葡萄糖，用 0.5mmol/L NaOH 调 pH 至 6.95～7.05，过滤除菌后，－20℃保存备用

2.5mol/L $CaCl_2$：过滤除菌，－20℃保存备用

PBS

细胞培养箱

6 孔板

移液器

微量离心管和滴管等细胞培养用耗材

步骤

1）传代细胞准备。在 6 孔板中接种 293 细胞，5×10^5 个细胞/孔，完全培养基培养过夜。

2）待细胞密度达 50%～60%满底时即可进行转染。加入沉淀前 3～4h，用 1.5ml 完全培养液培养细胞。

3）取经高压灭菌的 1.5ml 的离心管，依次加 H_2O 和 DNA，两者体积总和为 67.5μl/管，其中 DNA 用量为 4μg/管。用涡旋器混匀。

4）继续在该离心管中加入 2.5mol/L $CaCl_2$ 7.5μl/管，用涡旋器混匀，4℃保存孵育 20min。

5）用移液器贴壁加入 2×HEPES（4℃保存），75μl/管，立刻盖上盖子，倒转往复（动作轻柔，可以轻扣管壁），混匀后静置，并开始计时，室温下 5min。

6）将上述离心管中共 150μl/管中的液体加入 6 孔板的细胞培养液中，轻轻混匀。镜下观察应该可以看到十分细小而均匀的颗粒。37℃培养过夜。

7）次日换液（完全培养液）。转染后 24～48h 观察或检测。

注意事项

1）在整个转染过程中都应无菌操作。

2）为获得最佳实验结果，DNA-$CaCl_2$ 当充分混匀，2×HEPES 加入后需要立即混匀。

3）在实验中使用的每种试剂都必须小心校准，保证质量，因为甚至偏离最优条件 1/10 个 pH 都可能导致磷酸钙转染的失败。

（二）DEAE-葡聚糖法

以 Sigma 公司 DEAE-Dextran 转染为例来进行介绍说明。

材料与试剂

呈指数生长的 HEK293 细胞
完全培养液
纯化的质粒 DNA
DEAE-Dextran 转染试剂盒
PBS 或 HBSS
细胞培养箱
6 孔板
移液器
微量离心管和滴管等细胞培养用耗材

步骤

1）传代细胞准备。在 6 孔板中接种 293 细胞，5×10^5 个/孔，完全培养基培养过夜，使第 2 天转染时细胞能达到 40%～70%满。
2）37℃预热 PBS。对于待转染的 6 孔板中一个孔的细胞，离心管中依次加入适量 PBS、2μg DNA 以及 8μl DEAE-Dextran 溶液，使最终体积为 170μl，用移液器轻轻吹打混匀。
3）去除细胞培养液，用 PBS 洗涤细胞 2 或 3 次，吸除残留液体。
4）把 170μl DEAE-Dextran-DNA 混合物均匀滴加到细胞表面。
5）细胞培养箱内 37℃孵育 30min，孵育期间经常摇动培养板以保持所有细胞湿润。
6）每孔缓慢加入含氯喹（终浓度约为 80μmol/L）的 1.7ml 细胞培养液（约为 DEAE-Dextran-DNA 混合物体积的 10 倍）。
7）细胞培养箱内培养不超过 2.5h 或在出现明显的细胞毒性前，更换新鲜的完全培养液继续培养。
8）通常转染后 48～72h 可以检测转染效果。

注意事项

1）这里介绍的操作步骤是先混合 DEAE-Dextran 和 DNA，也可以先用 DEAE-Dextran 处理细胞再加入 DNA（根据说明书操作）。
2）在整个转染过程中都应无菌操作。
3）必须使用高纯度的 DNA。
4）转染前细胞必须处于良好的生长状态。
5）氯喹溶液对人体有害，请注意适当防护。
6）转染过程中尤其要注意的是混合 DEAE-Dextran-DNA 混合液时尽量轻柔，不可旋涡振荡混匀。

（三）脂质体法

以 Invitrogen 公司 Lipofactamine 2000 转染为例来进行说明。

材料与试剂

呈指数生长的 HEK293 细胞
完全培养液
无血清 Opti-MEM 培养基
纯化的质粒 DNA
Lipofactamine 2000 转染试剂
细胞培养箱
6 孔板
移液器
微量离心管和滴管等细胞培养用耗材

步骤

1）传代细胞准备。在 6 孔板中接种 293 细胞，5×10^5 个/孔，不包含抗生素的完全培养基培养过夜，使第 2 天转染时细胞能达到 30%～50%满。
2）37℃预热无血清 Opti-MEM 培养基。
3）对于待转染的 6 孔板中一个孔的细胞，取两个离心管，一管中加入适量无血清 Opti-MEM 培养基和 1μg DNA，使最终体积为 100μl；另一管加入适量无血清 Opti-MEM 培养基以及 10μl Lipofactamine 2000 溶液。用移液器轻轻吹打混匀。室温孵育 5min。
4）室温孵育 5min 后，混合两个离心管（分别是 DNA 混合液以及 Lipofactamine 2000 混合液）中液体，轻轻混匀，室温孵育 20min。
5）把 200μl 混合物均匀滴加到培养基中，“十”字形轻摇混匀。
6）细胞培养箱 37℃孵育 24～96h，直到适合进行基因表达分析。不需要去除复合物或者改换培养基；然而，在转染后 4～6h 改换培养基也不会损失转染的活性。

注意事项

1）在整个转染过程中都应无菌操作。
2）所有培养基中不含抗生素，稀释 DNA 以及 Lipofactamine 2000 最好用无血清 Opti-MEM 培养基。
3. 细胞培养过程中，可以含有血清，但是某些细胞在无血清情况下转染效率高。
4）稀释 DNA 和 Lipofactamine 2000 以及混合这二者后，室温孵育时间不可超过 30min。
5）在加入 Lipofactamine 2000 以前，应当将试剂混匀，避免试剂沉积在管底，影响脂质体实际含量。
6）Lipofactamine 2000 既可以转染贴壁细胞，也可以转染悬浮细胞（如 K562），需要适当调整细胞数目、转染试剂和 DNA 用量。

（四）电穿孔法

以 Amaxa 公司 Nucleofector 转染为例来进行说明。

材料与试剂

原代分离的 BALB/c 小鼠脾脏来源 T 细胞
完全培养液
纯化的质粒 DNA
Amaxa 公司核酸转染仪
小鼠 T 细胞 Nucleofector 溶液
PBS
细胞培养箱
12 孔板
移液器
微量离心管和滴管等细胞培养用耗材

步骤

1）分离脾脏 T 淋巴细胞，PBS 洗两次，计数细胞，调整细胞浓度到 $5\times10^{6}\sim1\times10^{7}$ 个/ml。
2）准备小鼠 T 细胞 Nucleofector 溶液。将 0.5ml 添加物（Supplement）溶液加入 2.25ml 小鼠 T 细胞 Nucleofector 溶液，轻轻混匀，4℃备用。
3）12 孔板每孔加入 1.5ml 小鼠 T 细胞 Nucleofector 溶液，37℃细胞培养箱中至少孵育 30min。
4）将细胞于室温下 90g 离心 10min，彻底去除上清。
5）用 100μl 小鼠 T 细胞 Nucleofector 溶液（室温）重悬细胞，加入 4μg 质粒 DNA，轻轻混匀，然后移入电击杯，盖上盖子。
6）选择适当的程序，将电击杯置入电击槽进行电脉冲操作。
7）立即取出电击杯，加入 500μl 小鼠 T 细胞 Nucleofector 溶液，将液体移入 12 孔板（总体积为 2ml）。
8）细胞培养箱 37℃孵育 24～72h，直到适合进行基因表达分析。转染后 3～24h 即可进行 T 淋巴细胞的激活实验。

注意事项

1）在整个转染过程中都应无菌操作。
2）小鼠 T 细胞 Nucleofector 溶液重悬细胞后，室温放置不可超过 15min，以免影响转染效率。

（五）聚乙烯亚胺（PEI）转染法

以 Polyplus 公司 JetPEI 转染为例进行说明。

材料与试剂

呈指数生长的 RAW264.7 细胞
完全培养液
纯化的质粒 DNA
JetPEI 转染试剂
PBS
细胞培养箱
6 孔板
移液器
微量离心管和滴管等细胞培养用耗材

步骤

1）传代细胞准备。在 6 孔板中接种 RAW264.7 细胞，1×10^5 个/孔（因为 RAW264.7 生长迅速且不易消化传代），完全培养基培养过夜。转染前使细胞能达到 50%～70%满。
2）对于待转染的 6 孔板中一个孔的细胞，取两个离心管，一管中加入 150mmol/L NaCl 和 3μg DNA，使最终体积为 250μl；另一管加入 150mmol/L NaCl 以及 6μl JetPEI 溶液。用枪轻轻吹打混匀。室温孵育 5min。
3）将 JetPEI 溶液立即加入 DNA 混合液，轻轻混匀，室温孵育 15～30min。
4）把 500μl 混合物均匀滴加到 2ml 完全培养基中，“十”字形轻摇混匀。
5）细胞培养箱 37℃孵育 24～72h，直到适合进行基因表达分析。

注意事项

1）在整个转染过程中都应无菌操作。
2）必须将 JetPEI 溶液立即加入 DNA 混合液，而不能将 DNA 混合液加入 JetPEI 溶液，否则将影响转染效率。
3）血清的存在不会影响转染效率。
4）在混合液加入细胞后，可以将 6 孔板低速短暂离心以促进聚合物与细胞的接触，可以增加转染效率。
5）如果在将混合液加入细胞后出现明显的细胞毒性，则可以在加入混合液 4h 后更换新鲜培养基。

这里主要列举的基因转染技术是以瞬时表达为例的，在瞬时表达的基础上可以利用载体携带的抗性基因（如潮霉素、新霉素、抗稻菌素等）进行稳定筛选，建立稳定表达细胞系，便于基因功能的研究。在实施实例中，参考了所列举产品的相关网站，对产品的相关说明进行了整理和挑选，详细的进一步资料可以参见相关公司的网站介绍。

基因的克隆和表达是一种有魔力的技术，通过合理设计与利用这些技术实现了在基因水平、蛋白质水平，乃至整体水平研究免疫学的各个方面的目标，如免疫细胞的分化、发育，免疫性疾病的发生、发展机制以及疾病的预防和治疗等。通过基因克隆和表达，人们可以表达各种蛋白质，如细胞因子，实现巨大的商业价值；利用基因克隆和表

达技术，人们研究了基因的结构、表达调控、生物学功能以及病理生理学意义；借助于基因克隆和表达技术，人们不断地发现和创新，人为地变化和控制基因的组成和组合。基因的克隆和表达本身也是一种艺术，不同的要求带来了不同的载体系统，不同的实践引发了精益求精的改进和创新。掌握了基因克隆和表达技术，就拥有了法力无边的魔术棒，改变基因就可以改变整个世界。学无止境，基因的克隆和表达技术远远未达到科技和艺术的顶峰。大道至简，方便有效将成为基因克隆和表达的最终目标。可以预期，未来的基因克隆和表达技术会更精彩。

（陈涛涌）

参考文献

顾健人，曹雪涛．2001. 基因治疗. 北京：科学出版社：24～45.

何金生，洪涛，王健伟．2001. 腺病毒载体构建原理与方法的研究进展．中华实验和临床病毒学杂志，15 (4)：399～400.

卢圣栋．1993. 现代分子生物学实验技术. 第2版. 北京：高等教育出版社：233～400.

孟庆勇，李宁．2002. 运用病毒载体实现基因治疗. 农业生物技术学报，10 (1)：98～102.

余祖华，丁轲，程相朝，等. 2008. 外源基因转染真核细胞技术的研究进展. 安徽农业科学，36 (21)，8954～8955.

Lundstrom K. 2003. Latest development in viral vector for gene therapy. Trends in Biotechnology，21 (3)：117～122.

Majhen D，Ambfiovic-Ristov A. 2006. Adenoviral vectors—how to use them in cancer gene therapy? Virus Res，119 (2)：121～133.

Szyda A，Paprocka M，Krawczenko A，et al. 2006. Optimization of a retroviral vector for transduction of human CD34 positive cells. Acta Biochimica Polonica，53 (4)：815～823.

Yin J，Li G，Ren X，et al. 2007. Select what you need：A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. J Biotechnol，127 (3)：335～347.

第十九章　RNA 干扰技术

第一节　概　　述

一、RNA 干扰的机制

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是正常生物体内抑制特定基因表达的一种方式，它是指将与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA（double stranded RNA，dsRNA）导入细胞后，导致该 mRNA 降解进而沉默基因表达的现象，这种转录后水平的基因调控，又被称为转录后基因沉默（post-transcriptional gene silencing，PTGS）。外源 dsRNA 进入细胞后，产生小分子干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA），其反义链与多种核酸酶结合形成了 RNA 诱导的沉默复合体（RNA-induced silencing complex，RISC），RISC 进而结合并剪切靶 mRNA 而介导 RNA 干扰的过程。RNAi 是一种抑制靶基因表达的简单、特异、高效的技术，已被广泛应用与生命科学研究的各个领域（黎燕和冯健男，2008；汤华，2006）。

RNA 干扰是通过一类较为稳定的中间介质实现的。在植物中，dsRNA 首先降解成为 35nt 左右的小 RNA，然后与靶 mRNA 序列通过互补配对结合，进而导致靶 mRNA 的降解。在果蝇中的研究证明，长度为 21～23nt 的小 RNA 是引起 RNA 干扰现象的直接原因。这种小 RNA 分子被统称为 siRNA。

在 RNA 干扰过程中，RNaseⅢ核酶家族中的 Dicer 发挥了重要作用。它通过与双链 RNA 结合，进而将其剪切为 21～23nt 及 3′端突出的小分子 RNA 片段，即 siRNA。随后 siRNA 与若干个蛋白质组成 RISC，并由该复合体主导 RNAi 效应。RISC 被活化后，活化型 RISC 受已成单链的 siRNA 引导，通过互补配对序列特异性地结合在靶 mRNA 上并切割靶 mRNA，引发靶 mRNA 的降解从而实现基因表达沉默。

在 RISC 复合体中，已发现包括 Dicer 在内的一些与 RNAi 相关的蛋白质分子。在果蝇中，Argonaute 2（AGO2）蛋白发挥重要作用，当 AGO2 蛋白表达降低时，RNAi 效应缺失，即证明 AGO2 在果蝇 RNAi 机制中发挥重要作用（Matranga et al.，2005）。研究表明，Argonaute 家族蛋白是一类具有 RNA 切割酶活性的蛋白分子家族，RNAi 机制正是通过 Argonaute 家族蛋白实现 RNA 切割活性（Filipowicz，2005）。此外，RNA 聚合酶也参与 RNAi 机制。在线虫中，EGO1 是一种 RdRP（RNA-dependent RNA polymerase），其在 RNAi 中十分重要，植物中也存在该蛋白质同系物。RNAi 中 RdRP 是将标靶 mRNA 作为模板，以导入的 dsRNA（或 siRNA）作为引物合成 RNA，在细胞内针对于靶 mRNA 合成新 siRNA 的酶（Vance and Vaucheret，2001）。这一反

应在一些生物的RNAi中为必需，但RdRP在人和果蝇的RNAi中是非必需的，这说明在不同物种之间RNAi的机制基本框架虽然相同，但依然存在部分差异。

RNAi具有以下几个主要特征：①RNAi在转录后水平沉默靶基因表达；②RNAi具有很高的特异性，仅降解与之序列互补配对结合的靶mRNA；③RNAi沉默靶基因的表达具有较高的效率，相对很少量的dsRNA分子（数量少于内源mRNA的数量）就能完全抑制相应基因的表达；④RNAi沉默靶基因表达可以穿过细胞界限，在不同细胞间传递和维持信号，甚至可传至整个有机体，以及具有可遗传等特点；⑤dsRNA不得少于21个碱基，并且长链dsRNA也在细胞内被剪切为21bp左右的siRNA，由siRNA来介导靶mRNA的剪切。大于30bp的dsRNA不能在哺乳动物中诱导特异的RNAi，而是细胞基因表达收到非特异性广泛的抑制进而导致细胞凋亡；⑥RNAi具有ATP依赖性：在去除ATP的样品中RNAi现象降低或消失，提示RNAi是一个ATP依赖的过程，因为Diecer酶和RISC介导的剪切反应必须由ATP供能。

二、RNA干扰的应用

RNAi现象在生物中存在的普遍性以及RNAi生物学功能和作用机制的初步阐明，使得RNAi的应用具备了一定的理论基础。在功能基因组学研究、生物信号转导和基因治疗等领域，RNAi的广泛应用使其取得了极大的进展。目前RNAi的应用可以初步归纳为以下几个方面。

（一）通过基因沉默研究基因功能

siRNA可通过互补配对实现对其靶mRNA特异和高效的干扰活力，进而使特定基因沉默，因此可以作为研究功能基因组学的一种有力的工具。研究表明，RNAi能够在哺乳动物中特异地抑制靶基因的表达，并且该抑制可以控制在发育的任何阶段，产生类似基因敲除的效应。与基因敲除技术相比，RNAi技术投入少、周期短、操作简单、易于实现。近来RNAi已成功应用于构建转基因动物模型，使得RNAi成为研究基因功能应用广泛且不可缺少的工具。

（二）治疗病毒性感染疾病

基于siRNA具有与mRNA互补配对结合进而实现mRNA降解的功能，设计能够和病毒RNA或mRNA互补结合的siRNA进而实现抑制病毒的功能和复制已有广泛报道，如难以治愈的病毒感染HIV、HBV及SARS冠状病毒等。siRNA能够在病毒感染早期有效地抑制病毒复制，病毒基因表达能被靶向针对病毒基因和相关宿主基因的siRNA所阻断，这些结果显示RNAi能够应用于许多病毒性感染的基因治疗，RNAi将成为一种有效的抗病毒治疗手段，在许多严重的动物传染性疾病的防治中亦具有重大的意义。

（三）遗传性疾病的基因治疗

美国西北大学的R. W. Carthew和日本基因研究所的Ishizuka等发现RNAi与脆性

X染色体综合征（与FMR-1基因异常相关的染色体病，导致患者智力低下）之间的密切关系，揭示了与RNAi机制缺陷相关的人类疾病（Carthew，2002）。遗传性疾病的RNAi治疗成为当今研究RNAi的又一大热点。

（四）肿瘤的基因治疗

肿瘤是由多基因长期相互作用而导致的结果，阻断单一癌基因的作用不可能完全抑制或逆转肿瘤的生长，而siRNA可以设计为针对同一基因家族的多个基因中同源性很高的保守序列，达到一种siRNA即可同时沉默多个基因表达的作用，也可以同时用多种siRNA将多个序列不相关的基因同时沉默。可表达siRNA病毒载体的成功构建，也为体内肿瘤治疗提供了可行的途径。

总之，随着RNAi机制研究的深入和RNAi技术的日趋完善，RNAi技术对于分子免疫学的研究和多种临床疾病的治疗已成为一种不可或缺的工具，本章仅就RNAi技术在免疫学研究中的应用做一些简要的陈述。

第二节　siRNA的设计与筛选原则

一、siRNA设计原则

如何设计有效的siRNA序列是RNAi试验能否成功的关键，通常认为siRNA序列的设计应尽量满足如下原则：①选择3′端带有AA的序列作为siRNA候选的靶序列（不包括AA重复），并通过GenBank数据库的Blast分析，删去与其他基因明显同源的靶位点。②因为多数基因序列在起始密码子区域或无义区域附近具有相似的序列而使得RNAi难以具有特异性，故应避免在起始密码子区域或无义区域附近选择靶序列。③候选siRNA序列的GC含量应尽量为40%～55%。④siRNA应根据mRNA的低二级结构的区域设计。⑤在dsRNA的正义链和反义链的序列上最好不要出现连续的3个或以上的T（构建siRNA表达载体或采用体外转录法合成siRNA时），因其可能会导致siRNA转录的提前终止。⑥在设计针对某靶基因的siRNA之前，可通过查阅相关文献，获得报道的有效的siRNA序列。⑦RNAi试验必须有无关siRNA序列对照，作为阴性对照的siRNA应与候选的siRNA序列具有相同的组成，但和靶标mRNA没有同源性，并最好通过GenBank数据库的Blast分析后无在人、鼠等物种中的同源序列。最简单的做法是选择通用阴性对照，即经过试验验证，在大量试验和文献中得到引用的序列。笔者习惯使用的对照siRNA序列为：5′-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3′（正义链）和5′-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3′（反义链），能基本满足阴性对照siRNA序列的要求。

二、siRNA干扰效率的检测与筛选

1. 靶基因mRNA水平的检测

常用半定量PCR、荧光实时定量PCR等方法检测siRNA靶向mRNA的表达水平，

这是检测筛选 siRNA 干扰效率最为简洁的初筛手段，方法概括为：①样本总 RNA 或 mRNA 的提取；②逆转录反应；③PCR，详见第十七章相关内容。

2. 靶基因蛋白水平的检测

检测 siRNA 靶基因的蛋白质水平是否降低，可以使用 Western 印迹法或细胞免疫化学法检测，这是检测筛选 siRNA 干扰效率的金标准，使用最为广泛，但需要特异性结合靶基因蛋白的抗体。在缺乏靶蛋白特异性一抗的前提下，可采用以下间接方法检测。

3. 靶基因蛋白水平的荧光检测

构建目的基因的表达载体，在目的基因的前后连接一个标记蛋白（如 EGFP）等，将候选 siRNA 与该表达载体共转细胞，运用 EGFP 的荧光强度间接检测出目的基因的表达量。此法可在没有靶蛋白特异性一抗的条件下实施，间接检测 siRNA 的干扰效率。但此法需构建载体，操作繁琐，且涉及质粒和 siRNA 的共转染，效率较低，故应用较少。

第三节 siRNA 的制备

目前较为常用的方法有化学合成，体外转录，长片段 dsRNA 经 RNaseⅢ酶降解体外制备 siRNA，构建 siRNA 的表达载体或病毒载体，PCR 制备 siRNA 表达框在细胞中产生 siRNA 等。

一、体外制备 siRNA

1. 化学合成

此法最为经典，使用最为广泛，由专门的公司负责合成。化学合成具有费用低廉、使用方便、易于转染、合成量足够、可控制性强、合成周期短、设计 siRNA 序列长度灵活、没有序列限制，以及方便化学修饰等优点，适用于绝大多数 RNAi 的试验。多数公司拥有强大的 siRNA 设计软件并提供 siRNA 设计服务，免去了设计 siRNA 的麻烦，其设计的 siRNA 通常提供 3 条序列，并一般承诺至少有 1 条序列有明显的抑制效率。因此，化学合成是 siRNA 合成的首选策略。

2. 体外转录

这种方法采用 RNA 聚合酶，以预合成的模板 DNA 链体外转录成 dsRNA。此法不能大规模合成 dsRNA，可适用于 siRNA 的筛选。体外用 RNaseⅢ酶消化长片段dsRNA 制备 siRNA。将 200～1000bp 的靶 mRNA 作为模板，用体外转录的方法制备长片段 dsRNA，后用 RNaseⅢ酶体外消化得 siRNA。此法无法知道具体发挥作用的 siRNA 片段的具体序列，使用极少。

二、体内表达 siRNA

1. siRNA 表达载体

常用的 siRNA 表达载体使用 U6 或 H1 的启动子，操纵一段小的发夹 RNA（short

hairpin RNA，shRNA）在哺乳动物细胞中表达，并通过添加一串（3～6个）U来终止转录。使用这类载体时，需合成2段编码shRNA序列的DNA单链并退火，克隆到相应载体的启动子下游，并经测序确定载体构建正确。siRNA表达载体的优点在于多数载体带有抗生素标记，可用于筛选稳定表达siRNA进而抑制靶mRNA的细胞株，可以进行较长期的研究。此类方法亦可构建表达siRNA的转基因小鼠，实现RNAi的体内实验。但此类方法涉及克隆，操作繁琐且耗时较长，不适用于筛选siRNA序列，且质粒的转染较RNA的转染更难，靶基因的抑制效率较直接转染siRNA低。

病毒载体也可用于表达siRNA，其优点在于可以用于感染转染难以实现的细胞（如T细胞等），并可用于体内实验，达到体内抑制某几种细胞中靶基因表达的目的。但构建病毒载体更为复杂繁琐，耗时更长，成功率不高，可交予有资质的生物公司构建。

2. siRNA表达框架

siRNA表达框架是由PCR得到siRNA表达片段，并克隆入载体直接导入细胞进行表达，该片段包含启动子，siRNA表达片段和终止位点。siRNA表达框架无载体构建步骤，相对较为简便，可用于筛选启动子和shRNA片段的最佳搭配。如果在PCR产物两端添加酶切位点，可在筛选后将该片段直接连入siRNA表达载体，完成siRNA表达载体构建。该方法也较为繁琐，很少使用。

第四节　影响RNAi效率的主要因素

一、转染效率

小片段RNA的转染相对于质粒较为容易，但对于不同的细胞，转染效率各异，应根据不同的实验要求灵活选择。不同公司的转染试剂对siRNA的转染效率和因此而产生的细胞毒性亦存在较大差异，应根据相关的工作经验选择。在摸索合适的转染试剂时，可使用荧光标记（FAM或FITC）的siRNA进行预实验，以摸索合适的转染试剂。脂质体转染有一定的细胞毒性，对转染耐受性比较差的细胞，更应谨慎选择合适的脂质体，并且摸索合适的转染时间，及时做好转染细胞的换液。转染细胞的密度也应当进行相应的预实验，转染细胞密度过低会因转染试剂的毒性过大等问题影响细胞生长，过高则会降低转染效率。一般认为在转染时控制细胞密度在50%左右，但对于不同的细胞则需摸索，此外还应考虑到细胞生长速度等因素，勿因细胞生长过满而影响细胞状态。

二、siRNA的有效性

由于设计的siRNA序列的本身性质以及靶mRNA常存在高级结构等问题，并非所有设计的siRNA序列都能有效的导致靶mRNA的降解，一般认为此时靠提高转染siRNA的终浓度没有意义，因为提高siRNA的转染量非但不能有效地抑制靶mRNA，反而会扩大RNAi的脱靶效应并提高转染造成的细胞毒性，故需重新设计siRNA序列。通常做法是设计多条针对靶mRNA的siRNA序列，选取靶基因抑制效率超过70%的

siRNA 序列进行后续实验。在化学合成 siRNA 时，一般会提供 3 条 siRNA 序列以供尝试（常规设计在靶 mRNA 的前部、中部和尾部），笔者尚未遇到 3 条 siRNA 均不能有效抑制靶基因表达的情况。

三、靶 mRNA 和靶蛋白的稳定性

不同的靶 mRNA 和蛋白质的稳定性是有差异的，由 mRNA 和蛋白质的不同半衰期决定。在 RNAi 实验中，有效的 siRNA 通常能在 24h 之内明显降低靶 mRNA 的表达量。但由于蛋白质的代谢较慢，靶蛋白的表达水平一般来说需至 48h 之后才出现明显的降低，有些蛋白质甚至在 96h 左右才有变化。因此，筛选有效的 siRNA 的快速方法是在转染后 24h 左右用 RT-PCR 法检测靶 mRNA 的表达水平，但仍需加以转染后期蛋白水平的检测以确证。如在 mRNA 和蛋白质水平上都能检测到明显的抑制效率，则可以认为 RNAi 实验成功。有文献推荐采用两次转染 siRNA 的方式（每次间隔 24h）来提高干扰效率，此法笔者并不推荐，因经粗浅尝试，两次转染的方式并不能明显提高转染及干扰效率，反而会加重转染带来的细胞毒性。因此，选择合适的转染试剂，摸索有效的 siRNA 序列，正确把握 siRNA 干扰的时间，获得良好的细胞状态和合适的转染条件，是 RNAi 实验成功的关键。

四、RNAi 操作细节

RNA 易于降解，环境中 RNA 酶存在极为广泛且难于灭活。因此，针对 RNA 的操作应十分小心。进行 RNAi 实验的吸头均需使用无 RNA 酶的吸头及吸头盒，如条件不允许，则必须将吸头和吸头盒经 DEPC 水处理后再高压灭菌。操作者应戴无滑石粉的手套进行操作，操作过程应十分小心，不可反复吹吸 siRNA 溶液。EP 管等其他和 siRNA直接接触的器材亦需确保无 RNA 酶的污染。

第五节　RNAi 应用实例

本节就小鼠 IRAK2 的 RNAi 对 VSV 诱导 RAW 细胞 IFN-β 表达的影响这一实验的具体流程做一举例，详述 RNAi 在分子免疫学信号转导研究中的应用（Hou et al.，2009）。

一、siRNA 的设计及合成

在 GenBank 中搜索小鼠 IRAK2 的 mRNA 序列，获得其 CDS，全长约 1.8kb。根据 CDS 序列，由软件辅助设计出 siRNA 序列 3 条（上海吉玛制药技术有限公司），分别位于该靶 mRNA 的前部、中部和后部，具体序列如下。IRAK2-81：5′-GGA UGC AGU UCG CUU CCU ATT-3′；3′-GACCU ACG UCA AGC GAA GGA U-5′。IRAK2-341：5′-CAG UCU AAG UAU UGC AGU ATT-3′；3′-GGGUC AGA UUC AUA ACG UCA U-5′。IRAK2-898：5′-CCC UCA UCC CGA CAA UAA ATT-3′；3′-GTGGG AGU AGG GCU GUU AUU U-5′。

如上 siRNA 序列由上海吉玛制药技术有限公司合成，合成量均为 1OD。根据产品

要求，将干粉制品的 siRNA 先离心（5000g 5min），后在超净台中小心打开管盖，每 OD siRNA 加入 1500μl 无菌 DEPC 水（上海生工），吹吸 2～3 次，振荡 5min，再置于 95℃水浴中 5min 并自然冷却至常温，使 siRNA 自然复性为双链。此时 siRNA 溶液的浓度为 2μmol/L。可进一步将该 siRNA 溶液分装保存于－20℃冰箱。

二、siRNA 的转染

小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞 1×10^5 个/孔（24 孔板）、4×10^5 个/孔（6 孔板）铺入细胞培养板中，过夜后细胞密度为 50%左右，于转染前换入新鲜含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，24 孔板 0.5ml/孔，6 孔板 2ml/孔。

在超净台中取出 8 个无菌无 RNA 酶的 Eppendorf 管，加入 100μl 无血清培养基（24 孔板），200μl（6 孔板），各 4 个。在 4 个 EP 管中分别加入无关 siRNA 对照，IRAK2-81、IRAK2-341、IRAK2-898 各 3μl（24 孔板）、11μl（6 孔板），使得转染 siRNA 终浓度为 10nmol/L。然后分别加入 2μl（24 孔板），6μl（6 孔板）Interferin Polyplus 公司转染试剂，并吹打 3～5 下混匀。常温静至 15min 后，分别加入培养板各孔中，略微摇晃数下混匀，将细胞置入孵箱中。6h 后，换去含转染试剂的培养基，换入新鲜的含血清 DMEM。

三、RNAi 干扰效率的检测

（一）IRAK2 mRNA 水平的检测

mRNA 样本抽提：转染 24h 后，收取 24 孔板细胞，使用细胞 mRNA 抽提试剂盒（如上海飞捷公司）提取 RAW 264.7 细胞 mRNA。具体为先弃去培养上清，PBS 洗净细胞，再将细胞裂解液加入培养板中，吹打数下以裂解完全。再将裂解液上柱，依据产品说明书抽提 mRNA。抽提后的 mRNA 样品经测浓度和检测抽提质量后，配平各管 RNA 浓度，即获得 mRNA 样本。

1. 逆转录

使用 Toyobo 公司逆转录试剂盒进行逆转录，逆转录体系为 10μl，具体为：RNA 样本 5.5μl（RNA 量约为 0.5μg）、dNTP 1μl、RNA 酶抑制剂 0.5μl、逆转录酶 0.5μl、5×缓冲液 2μl、Oligo dT 逆转录引物 0.5μl，逆转录体系的配置应在冰上进行。配置完成后，在 PCR 仪中进行逆转录，条件为 42℃ 30min，95℃ 5min（灭活逆转录酶），4℃ 5min（样本降温）。

2. 定量 PCR

首先获取内参 β-actin，IRAK2 检测引物，引物取自 Primer Bank（http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/），分别为：β-actin qPCR 上游：5′-AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3′、β-actin qPCR 下游：5′-GCA GCT CAG TAA CAG TCC GC-3′、鼠IRAK2 qPCR 上游：5′-GGA GTG AAG CAG ATG TCG TCC AAG C-3′、鼠 IRAK2 qPCR 下游：5′-GCA TCT GAG GCA GAG CTG CAT CTC T-3′。

定量 PCR 采用 20μl 体系，具体为：上游引物 0.5μl、下游引物 0.5μl、逆转录样本 1μl、双蒸水 8μl、定量 PCR super mix 10μl（TaKaRa 产品）。定量 PCR 在罗氏 Lightcycler 1.5 定量 PCR 仪上完成，具体条件为：95℃ 10s，55℃ 20s，72℃ 20s，78℃ 读孔，共计 35 个循环，后做熔链曲线以观察 PCR 产物的特异性，获得各样本 β-actin 和 IRAK2 的 Ct 值，并依据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各样本 IRAK2 mRNA的相对含量。

3. 结果

如图 19-1 示，可见 IRAK2-341 对 IRAK2 mRNA 的抑制效果最好。

（二）IRAK2 蛋白水平的检测

蛋白样本抽提：转染 48h 后，收取 6 孔板细胞，制成蛋白质样本。具体为将 6 孔板细胞弃去上清，PBS 洗净。每孔加入 100μl 细胞裂解液（Pierce 公司）和 0.5μl cocktail 蛋白酶抑制剂（Calbiochem 公司），用细胞刮刮下细胞，吸入 Eppendorf 管中（此步骤在冰上进行）。振荡 1min 后，Eppendorf 管放入 4℃离心机中离心（10 000g 5 min）。离心后吸取上清，取 5μl 样本稀释至 25μl 后使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒（Pierce 公司）测蛋白质浓度。依据蛋白质浓度配平各样本使其浓度一致，加入 Western 印迹蛋白缓冲液（上海博光），置 95℃水浴中 5min，即制成蛋白质样本。

Western 印迹：先将蛋白质样品在 8%浓度的 SDS-PAGE 胶中进行分离，转致醋酸纤维素膜上，剪下 65kDa 左右的膜（IRAK2）和 40kDa 左右的膜（内参 β-actin），孵育 IRAK2 特异性一抗（ProSci 公司）和 β-actin 特异性一抗（Sigma 公司）2h 后，TBST 液洗 3 遍，孵育 HRP 偶联的二抗 1h，再用 TBST 液洗 3 遍，后用底物显影曝光，检测 IRAK2和内参 β-actin 的表达量。结果证实 IRAK2-341 能够明显的抑制内源性 IRAK2 的表达，如图 19-2 所示。

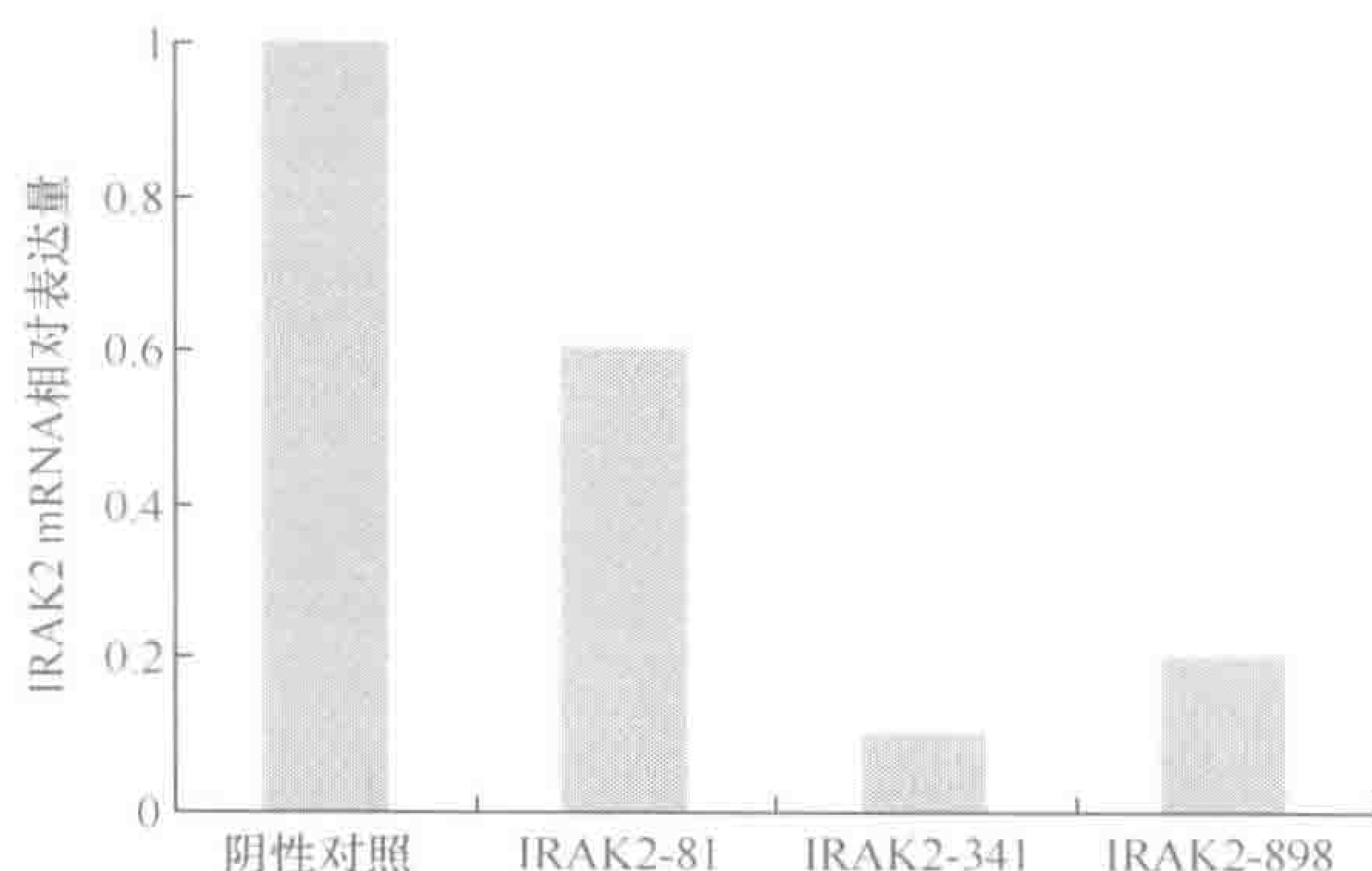


图 19-1　siRNA 对内源性 IRAK2 的沉默作用

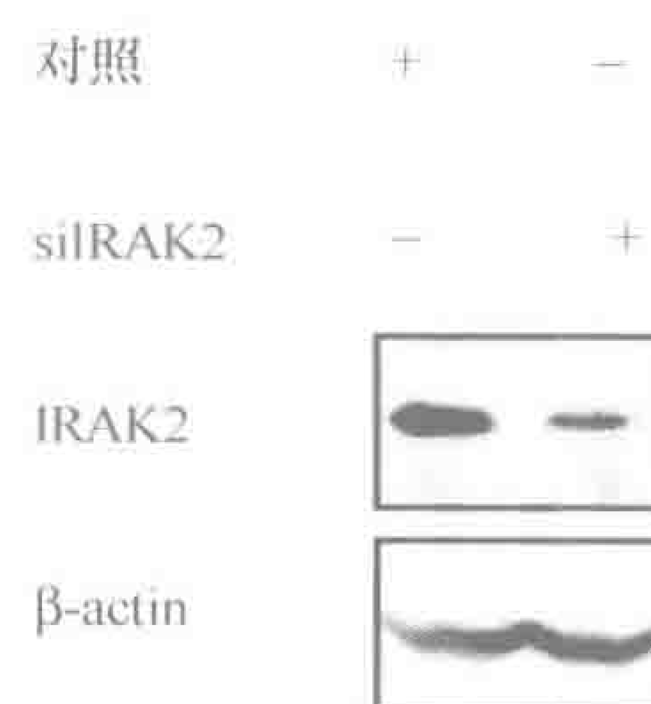


图 19-2　siRNA IRAK2-341 对内源性 IRAK2 表达的沉默作用

如此，本 RNAi 实验可认为成功实现了对靶基因的干扰。该实验可进一步用于探讨 IARK2 在分子免疫学信号转导中的作用。

（侯　晋）

参 考 文 献

黎燕，冯健男，张纪岩. 2008. 分子免疫学实验指南. 北京：化学工业出版社. 235～239.

汤华. 2006. RNA 干扰原理与应用. 北京：科学出版社. 149～213.

Carthew RW. 2002. RNA interference: the fragile X syndrome connection. Curr Biol, 2002 (12): 852～854.

Filipowicz W. 2005. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. Cell, 122(1): 17～20.

Hou J, Wang P, Lin L, et al. 2009. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. J Immunol, 183: 2150～2158.

Matranga C, Tomari Y, Shin C, et al. 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. Cell, 123(4): 607～620.

Vance V, Vaucheret H. 2001. RNA silencing in plants—defense and counter defense. Science, 292: 2277～2280.

第二十章　miRNA 技术

第一节　概　　述

microRNA（miRNA）是一类长度大约为 22nt 的非编码小片段 RNA，其进化保守，通过与 mRNA 的 3′UTR 相互作用进而调控 mRNA 的翻译，广泛作用于发育、肿瘤、炎症等各个生物学过程（Ying，2008；汤华，2006）。目前，在哺乳动物中已发现上千条 miRNA 序列，并且其数据库仍处于不断更新中，其中绝大部分的 miRNA 功能未明，miRNA 的研究是目前科学研究的热点之一（Bushati and Cohen，2007）。

1. miRNA 的发现

最早 miRNA 是于在研究线虫的发育过程中发现的，命名为 lin-4 和 let-7，其表达具有一定的时相性并通过作用于相应的靶基因进而调控线虫的发育，当时将这类小片段 RNA 称为 stRNA（small temporal RNA）（Brenda et al.，2000；Lee et al.，1993）。随后发现的 miRNA 则用数字进行命名，即“miR-#”（# 表示数字，如 miR-1、miR-2 等），而相对应的编码基因则用“miR-#”或“MIR-#”表示。

2. miRNA 的功能

目前，许多 miRNA 的功能研究还有待深入，但从已知的 miRNA 功能来看，其几乎涵盖生物学研究的各个领域。miRNA 的功能主要通过其作用的靶基因来实现，即 miRNA 通过调控靶基因的表达进而发挥生物学功能。因此在免疫学研究中，发现对免疫应答起重要作用的 miRNA 并找到该 miRNA 的作用机制，即找到该 miRNA 作用的靶基因并发现该靶基因的功能，即成为在免疫学领域研究 miRNA 功能的重点。

通常认为，在哺乳动物中，miRNA 主要与靶 mRNA 3′UTR 发生非完全互补配对结合，进而抑制靶 mRNA 的表达。其中 miRNA 第 2～7 位核苷酸对于这种结合发挥决定作用，被称为“种子序列”。许多 miRNA 找靶预测软件便基于此种特性预测 miRNA 的靶基因。此外，mRNA 3′UTR 中的靶点序列亦具有一定的进化保守性，并且一条 mRNA 的 3′UTR 可被多个 miRNA 作用，一条 miRNA 亦可作用于多条靶 mRNA，形成一个复杂的调控网络。在哺乳动物中，miRNA 作用于靶 mRNA 后，通常认为其不导致靶 mRNA 的直接降解，而是抑制靶 mRNA 的翻译，但亦有不少可致降解的报道。通过这种转录后调控基因表达的方式，miRNA 在免疫应答中发挥着重要的调控功能。

3. miRNA 的表达机制

miRNA 的表达是受某些因子调控的，目前对调控 miRNA 表达的机制和 miRNA 基因上的作用元件还不清楚。但 miRNA 的表达成熟过程已有了一定的研究。miRNA

的表达首先在核内合成成簇的 pri-miRNA，再经 Drosha 酶剪切，形成长约 70nt 的 pre-miRNA，其具有特征性的茎环结构，成熟体位于茎部序列并处于不完全互补配对的状态。pre-miRNA 经胞核转运蛋白 Exp-5 转运出核，由 Dicer 酶剪切成为成熟体的 miRNA，成熟的 miRNA 再进入 RISC 复合体（见第十九章）调控靶 mRNA 的表达。

4. miRNA 研究中的问题

由于绝大部分 miRNA 的功能和作用机制尚不清楚，目前对 miRNA 的研究主要集中于以下几个问题：①在生理及病理过程中寻找发挥重要作用的 miRNA；②探求这些 miRNA 的表达调控方式；③寻求这些 miRNA 的作用机制，即找寻它们的靶 mRNA；④miRNA 的自我调节方式等。本章就 miRNA 研究中经常使用的一些技术方法做简要叙述。

第二节　miRNA 序列数据库

miRBase 是 miRNA 序列和注释信息的在线数据库，由 Sanger 研究所维护。其提供了所有已明确的 miRNA 的详细信息，包括成熟体和前体序列，基因组位置等具体信息。此数据库可以在线浏览和搜索，网址为：http://microrna. sanger. ac. uk/。至 2009 年 7 月，miRBase sequence 已更新至 13. 0 版本，可提供如下功能。

1. 检索已知的 miRNA 的信息

在 miRBase sequence 主页中，直接输入给定的 miRNA 的名称，即可进入有该 miRNA 详细信息的页面，包括该 miRNA 的成熟体序列、前体序列、基因组位置、邻近表达的 miRNA 簇和主要的参考文献等内容。

2. 搜索 miRBase 序列数据库

在 miRBase sequence 主页中，进入 Search 页面，则可以根据 miRNA 的基因名、接受号（Accession No.）、关键词、基因组位置或者直接是一段序列，以检索与输入要求匹配的已知 miRNA。

3. 提交新的 miRNA

miRBase Registry 提供直接的网络形式，以方便使用者提交 miRNA 序列并命名。在描述 miRNA 发现的文献发表后，会赋予稳定的基因名称。

4. 下载 miRBase 数据库文件

在 miRBase sequence 主页中，进入 Download 页面，则可以下载 miRBase 的数据库文件，包括当前版本中各个物种的已知的 miRNA 序列信息。

5. 预测靶 mRNA

在 miRBase Targets 页面中，可对某一 miRNA 的可能靶 mRNA 进行预测（见本章第四节）。

第三节　miRNA的提取

以往以提取mRNA为主的柱式RNA抽提试剂盒无法抽提miRNA。抽提miRNA需使用能够吸附小片段RNA的玻璃纤维滤膜离心柱。许多公司出品miRNA抽提试剂盒，如Ambion公司的MirVana miRNA抽提纯化试剂盒，可以抽提包含miRNA的总RNA并可有效的进一步富集小片段RNA，Qiagen公司的miRNeasy miRNA抽提试剂盒等能够有效的保留小片段RNA，并且操作相对较为简单。

传统的酚-氯仿抽提法即可有效的沉淀小片段RNA，如Invitrogen公司的Trizol试剂、TaKaRa公司的RNAiso Plus试剂等，是抽提包含miRNA在内的总RNA的经济有效的方法。如抽提包含miRNA的总RNA，使用传统的酚-氯仿法即可，价格经济且操作简单，易于上手。因miRNA片段短，故较为稳定不易降解，酚-氯仿法抽提虽不能保证大片段RNA的完整性，但对于小片段RNA保存较好。该法对细胞量有一定要求，一般来说需大于10^6个，否则不易形成沉淀。

当细胞量比较少或样本比较珍贵时，可使用试剂盒抽提miRNA。Ambion公司的MirVana miRNA抽提纯化试剂盒使用最为广泛，且具有可以进一步富集小片段RNA的功能，但该试剂盒操作过于麻烦，如只需抽提包含miRNA的总RNA则并不推荐。Qiagen公司的miRNeasy miRNA抽提试剂盒操作过程则相对较为简单，且RNA提取质量稳定，具体操作方法可见产品说明书，在此不赘述。

包含miRNA的总RNA可进一步通过PAGE胶回收18～26nt的小片段RNA，具体方法如下。

1. 15%PAGE的制备

尿素7.2g，10×TBE 1.5ml，40%PAGE（丙烯酰胺：甲叉=19：1）5.6ml，补充DEPC水至15ml，混匀后加入：10% AP 75μl，TEMED 8μl。加入TEMED后迅速灌胶。60V电压预电泳30min。

2. 上样与跑胶

样本与2×上样缓冲液等体积混匀。总RNA的量需达到1mg左右，小RNA的量需达到50μg左右。样本煮沸3～5min，冷却至常温后上样。上样前需使用注射器将上样孔冲洗数遍，否则RNA难以跑下。上样后，300V电泳至溴酚蓝跑到胶的4/5时停止电泳。卸胶，放入含1μg/ml EB的1×TBE中染色5min，再用含0.2mmol/L $MgCl_2$的TBE摇动脱色5min。

3. 回收

在紫外灯下切下18～26nt大小的条带回收。将切下的条带放入EP管中，用枪头捣碎，加入4×体积的溶胶液（溶胶液：20mmol/L Tris pH8.0，1mmol/L EDTA，0.4mol/L乙酸铵，0.5% SDS），37℃振荡过夜。过夜后，8000g离心5min，吸取上清至新的EP管中，加入4倍体积的无水乙醇，1μl 20μg/μl的糖原，混匀后置－20℃4h。4℃下最高转速离心30min，弃上清。加入1ml 75%的乙醇洗涤，4℃下最高转速离心

15min，弃上清，并重复1次。弃去上清并风干后，加入30μl DEPC水溶解沉淀并测定RNA浓度及质量。

第四节　miRNA表达谱分析

研究miRNA的生物学功能常首先立足于分析不同组织或细胞及其在不同功能状态下的miRNA表达谱。目前针对miRNA表达谱分析的技术主要有测序和芯片两个手段最常使用，对于通过这两种手段分析得到的差异表达的miRNA，则常使用qRT-PCR法和杂交法以进一步确证。

一、miRNA表达谱的高通量分析方法

miRNA表达谱的高通量分析方法以miRNA芯片最为常用，其原理与cDNA芯片相似并做了一定的改进。miRNA芯片通常由生物公司完成，目前国内主要的公司有康成（代理丹麦Exiqon公司LNA miRNA microarray）、联川（代理LC sciences公司miRNA microarray），博奥（国产miRNA芯片）等公司。miRNA芯片有单色芯片和双色芯片两种，双色芯片针对两个样本并分别标记Cy3和Cy5两种颜色后再进行杂交，因miRNA芯片十分敏感，应尽量使用双色芯片以使实验条件均一化。但如果涉及多于2个样本的平行比较，则只能使用单色芯片，但实验结果的可重复性会打一定折扣。就康成公司和联川公司的miRNA芯片技术服务而言，相比之下更推荐联川的LC sciences miRNA microarray，因其结果的可重复性更好。miRNA芯片十分敏感，因此其结果假阳性率高，故必须通过后续实验如qRT-PCR或杂交以进一步确证。

获得miRNA表达谱的传统方法为克隆测序法，该法首先提取总RNA并通过跑PAGE胶分离纯化回收18～26nt的小片段RNA，随后在RNA分子两端用T4 RNA连接酶连接接头并通过逆转录构建cDNA文库，再连入载体测序，每一个测序的质粒含有数个小RNA分子。目前miRBase中绝大部分序列都是通过克隆测序法获得的，其在miRNA的早期研究中功不可没。虽然克隆测序法具有精确性高等优点，但其速度慢、灵敏度低、效益成本比低，已逐渐被其他的高通量第二代测序法所取代。

第二代测序技术已被应用于检测细胞或组织中的miRNA表达谱，这种技术是一种独特的文库克隆测序方法，被称为大规模平行测序技术（massively parallel signature sequencing，MPSS），主要以Illumina公司的Solexa技术，罗氏公司的454测序和ABI公司的SOLiD技术为代表。该过程不采用标准的测序方法，而是采用一种基于珠子的技术对来自克隆文库的成百上千个克隆进行快速测序，测序长度超过20个碱基。该技术不但可以测定已知的miRNA及其表达的拷贝数，用于比较不同样本中miRNA的表达差异，还可以测得大量的新的miRNA候选（miRNA candidate）。就Illumina公司的Solexa技术而言，该技术快速、准确且信息量大。测序结果的生物信息学分析是该技术后期分析的关键部分，选择有资质的公司（如华大公司）进行生物信息学分析对于结果的解读十分重要。如条件许可，使用大规模平行测序技术是挖掘组织或细胞miRNA表达谱的最佳方法。

二、qRT-PCR 法鉴定单个 miRNA 的表达差异

对于鉴定某一特定的 miRNA 在不同样本中的表达差异，qRT-PCR 法是一种灵敏度高、准确性好、操作简便易行的方法，是鉴定 miRNA 表达差异的首选低通量方法。引物设计是 qRT-PCR 法的关键，因为 miRNA 过于短小，故 miRNA 的逆转录通常采用特异性长片段逆转录引物，而在 PCR 过程中通过扩增长片段逆转录产物以鉴定该 miRNA 的表达量。ABI 公司首先报道的在逆转录过程中使用茎环逆转录引物的方法被广泛使用，并且该公司出品的针对不同 miRNA 的 qRT-PCR 试剂盒结合了 TaqMan 探针技术，使得 qRT-PCR 实验中 RNA 样本量需求较少、扩增更为特异、更易区分序列相似的 miRNA（Chen et al.，2005）。

如下就检测总 RNA 样本中 miR-146a 表达的实验做一简要叙述（Hou et al.，2009）。

1. 总 RNA 的提取

使用 RNAiso Plus 试剂提取细胞总 RNA，按照试剂盒要求操作，在此不赘述。总 RNA 提取完成后测定浓度和质量。

2. 逆转录

根据 miR-146a 成熟体序列，使用茎环引物作逆转录，引物序列如下。miR-146a 成熟体序列：5′-UGA GAA CUG AAU UCC AUG GGU U-3′；miR-146a 逆转录引物：5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC A ACC C-3′。加框部分与 miR-146a 成熟体 3′端反向互补。

逆转录采用 Toyobo 公司逆转录试剂盒进行逆转录，逆转录体系为 10μl，具体如下：RNA 样本 5.5μl（RNA 量约为 0.5μg）、dNTP 1μl、RNA 酶抑制剂 0.5μl、逆转录酶 0.5μl、5×缓冲液 2μl、miR-146a 逆转录引物 0.5μl 。逆转录体系的配置应在冰上进行。配置完成后，在 PCR 仪中进行逆转录，条件为 42℃ 30min，95℃ 5min（灭活逆转录酶），4℃ 5min（样本降温）。

3. 定量 PCR

miR-146a 的逆转录 cDNA 序列为 5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA ACC CAT GGA ATT CAG TTC TCA-3′。据此 cDNA 序列，设计 PCR 扩增引物。上游引物：5′-AGC AGT GAG AAC TGA ATT CCA T-3′；下游引物：5′-GTG CAG GGT CCG AGG T-3′。

定量 PCR 采用 20μl 体系，具体如下：上游引物 0.5μl、下游引物 0.5μl、逆转录样本 1μl、双蒸水 8μl、定量 PCR super mix 10μl（TaKaRa 产品）。

定量 PCR 在罗氏 Lightcycler 1.5 定量 PCR 仪上完成，具体条件为：95℃ 10s、55℃ 20s、72℃ 20s、78℃读孔，共计 35 个循环，后做熔链曲线以观察 PCR 产物的特异性，亦可将 PCR 产物跑胶回收后连入 T 载体测序，以观察 PCR 产物的特异性。

三、杂交法检测 miRNA 的表达

杂交法检测 miRNA 的表达操作较为复杂，如使用 qRT-PCR 法能够较好地扩增目的 miRNA，则应尽量避免使用杂交法检测目的 miRNA。杂交法检测目的 miRNA 主要有 3 种方法：传统 Northern 杂交法、液相杂交法、原位杂交法。其中传统 Northern 法与原位杂交法原理相似，均与 mRNA 的 Northern 杂交法相同，均依赖带标记的探针与靶片段互补结合，进而依赖结合探针的多少和最终信号的强弱确定靶片段表达量的高低。这两种方法检测 miRNA 表达的阳性率较低，对于检测表达丰度较高的 miRNA 可以采用，检测表达丰度较低的 miRNA 则不推荐，因为最终信号往往检测不到。液相杂交法检测 miRNA 表达较传统 Northern 法敏感性有较大提高，其原理是依赖标记探针与目的 miRNA 互补结合后，不能被 RNA 酶所降解，而未结合的探针则被降解。通过检测最终体系中所剩的探针量反映目的 miRNA 的表达量。这种方法不需转膜，跑胶后直接显影，因而敏感性较高。如必须用杂交法检测目的 miRNA 的表达，则建议尽量使用液相杂交，操作简便且敏感性较高。杂交法的商业化试剂盒较为成熟，如 Ambion 公司的 Northern 和液相杂交试剂盒等，操作方法按产品说明书，在此不赘述。

杂交法所使用的探针较为关键。目前探针的标记方法主要有 3 种：同位素标记、生物素标记、地高辛标记。同位素标记通常采用 ^{32}P 标记的 U，而生物素标记则 A、U、C、G 均有标记的核苷酸销售（Roche 公司）。同位素标记的探针虽具有放射性，对于操作人员素质和实验场地要求较高，但其结果稳定，仍具有一定的使用价值。生物素和地高辛标记的探针因可避免放射性污染，且敏感性高，故使用较多。探针的合成方法多采用体外转录法，可使用 Ambion 公司的体外转录试剂盒，按说明书操作即可。

总之，在检测组织或细胞 miRNA 表达谱的高通量分析方法中，如实验条件允许，建议采用第二代测序技术以获得高通量试验结果。miRNA 芯片只是一种较为便宜的仅能反映表达量变化的实验技术，信息量较前者低。针对检测特定 miRNA 表达的实验技术，则建议尽量使用 qRT-PCR 技术，应能够达到实验的要求。

第五节　miRNA 靶位点预测

miRNA 通过和 mRNA 3′UTR不完全互补配对而抑制 mRNA 的功能，进而调控靶基因的表达。寻找已知 miRNA 的功能必须找到该 miRNA 的靶基因。miRNA 靶位点的生物信息学预测为找靶实验提供了一定的方向。熟练应用 miRNA 靶位点生物信息学预测工具是 miRNA 研究者的必备技能。

miRNA 和靶 mRNA 的相互作用具有一定的规律，可以通过计算机程序实现预测。程序的设计主要通过 miRNA 和靶基因相互作用的如下特点来实现：①种子序列的完全互补配对：种子序列指 miRNA 5′端的第 2～7 位核苷酸，这段序列应与靶 mRNA 3′UTR序列完全互补配对，miRNA 3′端的序列则不要求完全互补；②靶位点的跨物种保守性：miRNA 具有很好的跨物种保守性，其作用的靶位点也具有一定的跨物种保守性。

目前常用的 miRNA 靶位点预测软件以及其网站如下（按使用频率由高到低排序）：① Targetscan：http://www.targetscan.org/；② miRanda：http://www.microrna.org/microrna/home.do；③ PicTar：http://pictar.bio.nyu.edu/；④ miTarget：http://cbit.snu.ac.kr/～miTarget/；⑤ RNA22：http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html。

miRNA 靶位点预测软件的算法各异，通常综合比较不同预测软件的不同结果会对实验验证有一定帮助。miRNA 的靶基因很多，称为 Targetome，曾有文献报道单个 miRNA 能够作用的靶基因有数百个。在不同的实验体系中，从庞杂的靶位点预测结果中找到能够在该体系中发挥功能的靶分子是 miRNA 找靶实验的关键。因此，预测软件的能量打分和保守性打分仅能作为 miRNA 找靶实验的参考，找到可能的并能够在实验体系中发挥作用的靶分子，并加以实验验证，才是 miRNA 找靶实验的意义所在。

第六节　miRNA 靶基因的实验验证

目前验证 miRNA 和靶基因相互作用的主要方法是通过荧光素酶报道基因系统实现的。其原理是将靶基因 mRNA 的 3′UTR 区域克隆至萤火虫荧光素酶报道基因的 3′UTR，构建能够表达带有靶基因 3′UTR 的荧光素酶基因。将该质粒和内参质粒，以及 miRNA 的对照或目的 miRNA 共转染细胞，通过观察该 miRNA 能否降低萤火虫荧光素酶的表达来确定该 miRNA 是否能够作用于该靶基因的 3′UTR。

以下就 mmu-miR-146a 作用于鼠 IRAK2 的实验做一举例（Hou et al.，2009）。

1. miR-146a 的靶基因预测

通过 Targetscan 靶基因预测网站，发现鼠 IRAK2 基因的 3′UTR 含有 3 个 miR-146a 可能作用的靶点，均为非保守序列，具体如图 20-1 所示。

```
       Position 353-359 of IRAK2 3′ UTR   5′ ...GCCCCCAAACCUCUUAGUUCUCC...
靶点1                                             ||||        |||||||
       mmu-miR-146                        3′    UUGGGUACCUUAAGUCAAGAGU

       Position 486-493 of IRAK2 3′ UTR   5′ ...GCCGGUGUCUCCGCAAGUUCUCA...
靶点2                                              ||          |||||||
       mmu-miR-146                        3′  UUGGGUACCUUAAG—UCAAGAGU

       Position 869-875 of IRAK2 3′ UTR   5′ ...AUGUAUCUGUUCUGU—GUUCUCAA...
靶点3                                                ||          ||||||
       mmu-miR-146                        3′     UUGGGUACCUUAAGUCAAGAGU
```

图 20-1　miR-146a 靶位点预测

2. 将鼠 IRAK2 的 3′UTR 区域构建至萤火虫荧光素酶报道基因的 3′UTR 区域

通过检索 GenBank，获得鼠 IRAK2 的 3′UTR 序列，据此设计引物。上游：5′-GACTAGT TGACCAGCGCACAGCTGAAGACCCTTAT-3′；下游：5′-CCCAAGCTT TGTTTGCAACATGACTTTTCAAAAATATATTCACTTCATAAAC-3′。引物带有酶切位点 *Spe* Ⅰ/*Hind* Ⅲ，扩增产物构建入 Ambion 公司载体 pMIR-report 中，即构建

成为带有 IRAK2 3′UTR 的萤火虫荧光素酶报道基因。

3. 转染

转染涉及 RNA 与质粒的共转，脂质体的选择十分重要，使用支持 RNA 和质粒共转的转染试剂 jetSI-ENDO（Polyplus 公司）。转染使用 HEK 293 细胞，铺 96 孔板，每孔 1×10^4 细胞，次日按转染试剂说明书操作，具体组合如下。

组 1：空载体 pMIR-report 80ng＋TK 内参 40ng＋对照 miRNA（终浓度20nmol/L）

组 2：空载体 pMIR-report 80ng＋TK 内参 40ng＋miR-146a（终浓度20nmol/L）

组 3：pMIR-report-IRAK2 80ng ＋ TK 内参 40ng ＋ 对照 miRNA（终浓度20nmol/L）

组 4：pMIR-report-IRAK2 80ng＋TK 内参 40ng＋miR-146a（终浓度 20nmol/L）

4. 荧光检测与结果判读

转染 24h 后，裂解细胞并作荧光检测。细胞裂解液和荧光检测底物购自 Promega 公司，操作按说明书进行。细胞裂解后在荧光素检测仪上自动反应读板，使用 BioTek 公司的双荧光素酶自动检测仪检测荧光。根据结果，算出各复孔的平均荧光值，并相互比较，计算 P 值，评价显著性。结果如图 20-2 所示。

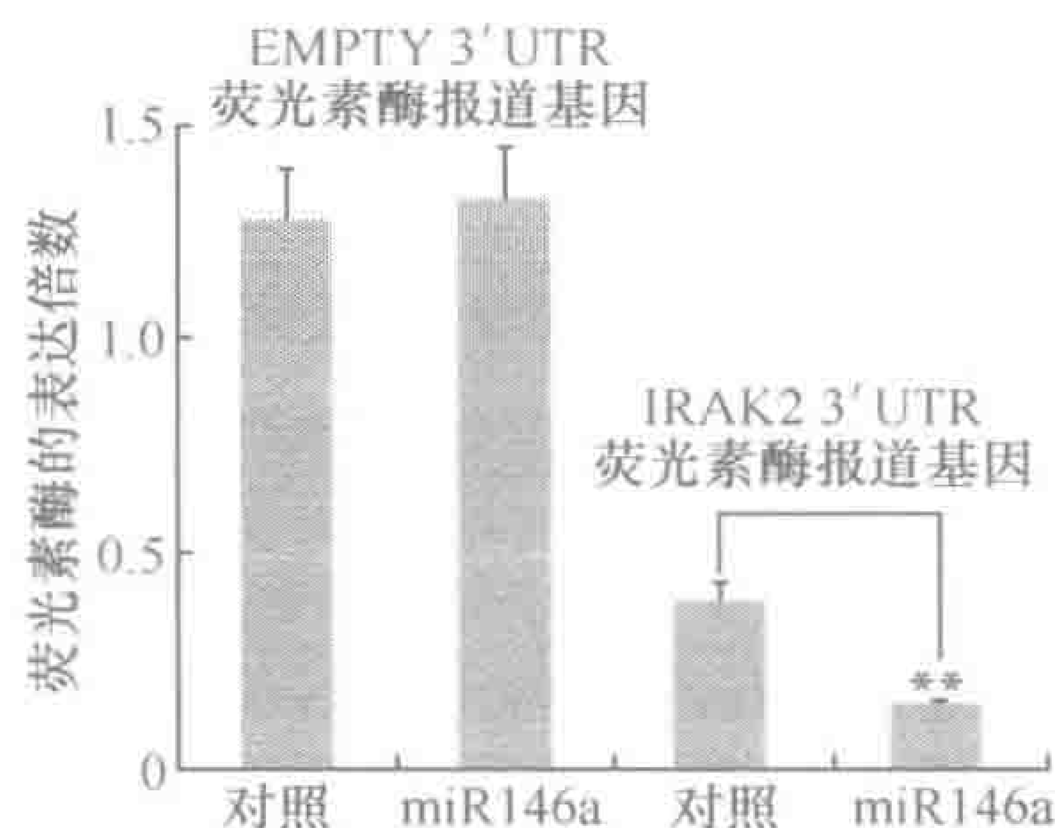


图 20-2 miR-146a 抑制 IRAK2 3′UTR 报道基因的表达

如上便是一个较为完整的验证 miRNA 与靶基因相互作用关系的实验。如实验条件不允许，亦可将靶基因 3′UTR 序列构建入 GFP 表达质粒的 3′UTR 区域，通过流式细胞仪检测转染后细胞的平均荧光强度，以此反应 miRNA 是否抑制了含有靶基因3′UTR 的 GFP 表达。但此法与报道基因法比较，缺少内参照，因此不能平衡组间的转染效率差异，故较报道基因法而言使用相对较少。

第七节 发现病毒编码 miRNA 的一般策略

目前，已有多篇文献报道病毒能够编码 miRNA，并能够发挥一定的生物学功能，如抑制感染细胞的调亡、影响机体对病毒的识别、抑制病毒自身复制以实现病毒潜伏等（Gottwein and Cullen，2008）。现认为能够编码小 RNA 的病毒具有如下特性：①DNA 病毒更易表达 miRNA：因机体负责 miRNA 表达和剪切的酶多位于核内，DNA 病毒入

核后，能够利用胞内存在的 miRNA 表达剪切系统表达病毒编码的 miRNA；②慢性长期感染：急性感染的病毒多引起强烈的免疫应答，进而造成病毒的清除，慢性感染的病毒有一系列机制实现潜伏，病毒编码的 miRNA 亦参与其中；③与宿主基因组整合：DNA 病毒与宿主基因组整合后，利用宿主系统表达 miRNA。

针对病毒表达的 miRNA 目前有两大类方法：一是基于生物信息学预测的方法，此法根据 miRNA 前体的茎环结构特点，预测病毒基因组上可能表达 miRNA 的区域，再辅以实验验证，此法以预测软件 VirMir 为代表；二是基于大规模平行测序的方法（如前述的 Solexa），此法较为准确且信息量大，测得的病毒来源的 miRNA 序列，并且在未感染的样本中不表达，则可以较为肯定的认为是病毒编码的 miRNA。

确定病毒编码的 miRNA 仍需多种实验技术以验证，如在病毒感染的样本中使用 PCR 法扩得了该 miRNA 序列，使用杂交法检测到了该序列并在未感染样本中无法检测到等。因机体的 miRNA 表达谱十分复杂，在验证病毒编码的 miRNA 的过程中需要十分小心。

发现病毒编码的 miRNA 的功能可以从以下几个方面入手：①该 miRNA 是否影响病毒本身的复制；②该 miRNA 是否影响感染细胞的凋亡途径；③该 miRNA 是否影响机体对病毒的识别以及机体的抗病毒反应途径；④该病毒 miRNA 是否与机体本身的 miRNA 有一定的同源性，进而模拟机体本身 miRNA 的功能；⑤该病毒 miRNA 是否能与机体本身的 miRNA 发生相互作用。

关于病毒编码 miRNA 及其功能的研究目前尚处于起步阶段。miRNA 既可作为病毒实现自身功能的工具，又能够为宿主所用实现抗病毒的功能。因此，在 miRNA 层面上设计抗病毒的药物，应具有广泛的应用前景。

（侯　晋）

参考文献

汤华. 2006. RNA 干扰原理与应用. 北京：科学出版社.

Brenda J, Reinhart, Frank J, et al. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 403: 901～906.

Bushati N, Cohen SM. 2007. microRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol, 23: 175～205.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res, 33: e179.

Gottwein E, Cullen BR. 2008. Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. Cell Host Microbe, 3(6): 375～387.

Hou J, Wang P, Lin L, et al. 2009. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. J Immunol, 183: 2150～2158.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 75: 843～854.

Ying SY. 2008. miRNA 实验指南. 郑小飞. 北京：化学工业出版社.

第二十一章　蛋白质电泳和鉴定技术

电泳是指带电胶体颗粒在电场的作用下发生迁移的过程。许多重要的生物分子，如氨基酸、多肽、蛋白质、核苷酸、核酸等均具有可电离基团，它们在某一特定的 pH 下可以带正电或负电，在电场的作用下，这些带电分子会向着与其所带电荷极性相反的电极方向移动。电泳技术就是利用在电场的作用下，使待分离样品中各种分子因分子质量大小、形状等性质的差异，使带电分子产生不同的迁移速度，从而对样品进行分离、鉴定或提纯的技术。早期的自由界面电泳没有固定支持介质，电泳过程中样品的扩散和对流都比较强，分离效果不佳。目前应用的大多数电泳技术均为需要固定支持介质的电泳，样品在固定的介质中进行，减少了扩散和对流等干扰作用。根据支持介质不同，电泳技术可分为纸电泳（paper electrophoresis）、醋酸纤维薄膜电泳（cellulose acetate electrophoresis）、琼脂凝胶电泳（agar gel electrophoresis）、聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis）(PAGE）和十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）。

最初使用的支持介质如滤纸和醋酸纤维素膜，适合于分离小分子物质，但对于复杂的生物大分子则分离效果较差。目前这些介质在实验室已经应用得较少，大多已被更灵敏的分离技术如 HPLC 替代。凝胶作为支持介质的引入大大促进了电泳技术的发展，使电泳技术成为分析蛋白质、核酸等生物大分子的重要手段之一。目前使用得最多的是琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。前者主要用于核酸的电泳分离，而后者主要用于蛋白质及多肽的分离与鉴定。

自从 20 世纪 70 年代，聚丙烯酰胺凝胶作为一种新型的支持介质开始应用于蛋白质的凝胶电泳，该方法具有设备相对简单、分辨率高、操作简便等特点，已成为蛋白质及多肽最常用的分析手段。聚丙烯酰胺凝胶是由单体的丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺聚合而成。聚丙烯酰胺凝胶的孔径可以通过改变丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的浓度来控制，丙烯酰胺的浓度可以为 3%～30%。低浓度的凝胶具有较大的孔径，如 3%的聚丙烯酰胺凝胶对蛋白质没有明显的阻碍作用，可用于平板等电聚焦或 SDS-PAGE 的浓缩胶，也可以用于分离 DNA；高浓度凝胶具有较小的孔径，对蛋白质有分子筛的作用，可以用于根据蛋白质的分子质量进行分离的电泳中，如 8%～20%的凝胶常用于 SDS-PAGE 的分离胶。

第一节　蛋白质电泳技术

一、SDS-PAGE

SDS-PAGE 是在含有 SDS（十二烷基磺酸钠）条件下进行的聚丙烯酰胺凝胶电

泳。SDS能断裂分子内和分子间氢键，破坏蛋白质的二级和三级结构，强还原剂能使蛋白质分子内及分子间的二硫键断裂，因此蛋白质在一定浓度的含有强还原剂的SDS溶液中，与SDS分子按重量成比例结合，形成带负电荷的SDS-蛋白质复合物，从而降低或消除了各种蛋白质分子之间天然的电荷差异，在进行电泳时蛋白质分子的迁移速度基本取决于分子质量的大小。SDS-PAGE是最常用的定性分析蛋白质的电泳方法，特别是用于蛋白质纯度检测和测定蛋白质分子质量。根据所分离的蛋白分子质量，选择合适浓度的丙烯酰胺凝胶（表21-1），可使蛋白质在凝胶上得到满意的分离效果。

表21-1　SDS-PAGE凝胶的有效分离范围

丙烯酰胺浓度/%	15	12.5	10	7.5	5.0
线性分离范围/kDa	15～43.5	15～60	18～75	30～120	60～220

材料与试剂

5×样品缓冲液（10ml）：0.6ml 1mol/L的Tris-HCl（pH6.8），5ml 50%甘油，2ml 10%的SDS，0.5ml巯基乙醇，1ml 1%溴酚蓝，0.9ml蒸馏水。可在4℃保存数周，或在−20℃保存数月

30%丙烯酰胺凝胶贮液：在通风橱中，称取丙烯酰胺30g，亚甲双丙烯酰胺0.8g，加双蒸水溶解后，定容到100ml。过滤后置棕色瓶中，4℃保存，一般可放置3个月。注意：丙烯酰胺与亚甲双丙烯酰胺均为神经毒剂，在称取过程中应该戴手套、口罩，在通风橱内进行

pH8.9分离胶缓冲液：Tris 36.3g，加1mol/L HCl 48ml，加双蒸水80ml使其溶解，调节pH至8.9，定容至100ml，4℃保存

pH6.7浓缩胶缓冲液：Tris 5.98g，加1mol/L HCl 48ml，加重蒸水80ml使其溶解，调节pH至6.7，定容至100ml，4℃保存

TEMED（四甲基乙二胺）原液

10%过硫酸铵（用双蒸水新鲜配制）

pH8.3 Tris-甘氨酸电泳缓冲液：称取Tris 6.0g，甘氨酸28.8g，加蒸馏水约900ml，调pH8.3后，用蒸馏水定容至1000ml。置4℃保存，临用前稀释10倍

步骤

最常用的方法来源于1970年Laemmli的方法，凝胶电泳设备有多种商品化的产品可供选择，目前在国内众多实验室中使用最多的是BioRad mini-Protein Ⅲ为及GE Amersham SE250等。其操作方法基本相同。

1）样品处理。根据样品分离目的不同，主要有3种处理方法：还原SDS处理、非还原SDS处理、带有烷基化作用的还原SDS处理。

还原SDS处理：在还原剂中加入SDS和DTT（或2-巯基乙醇）后，蛋白质构象被解离，电荷被中和，形成SDS与蛋白质相结合的分子，在电泳中，只根据分子质量来分离。一般电泳均按这种方式处理，样品稀释适当浓度，加入上样

缓冲液，离心，沸水煮5min，再离心加样。

带有烷基化作用的还原SDS处理：碘乙酰胺的烷基化作用可以很好的并经久牢固的保护—SH基团，得到较窄的谱带；另外，碘乙酰胺可捕集过量的DTT，而防止银染时的纹理现象。100μl样品缓冲液中加入10μl 20%的碘乙酰胺，并在室温孵育30min。

非还原SDS处理：生理体液、血清、尿素等样品，一般只用1%SDS沸水中煮3min，未加还原剂，因而蛋白质折叠未被破坏，不可作为测定分子质量来使用。

2）将玻璃板、样品梳用洗涤剂洗净，用双蒸水冲洗数次，再用乙醇擦拭，晾干（在上一次电泳结束后就必须进行清洁）。

3）将两块洗净的玻璃板（长板与短板）在平整的桌面上组装完毕，放入玻板夹中，夹紧后放入制胶架上，固定，即可进行灌胶操作（图21-1）。

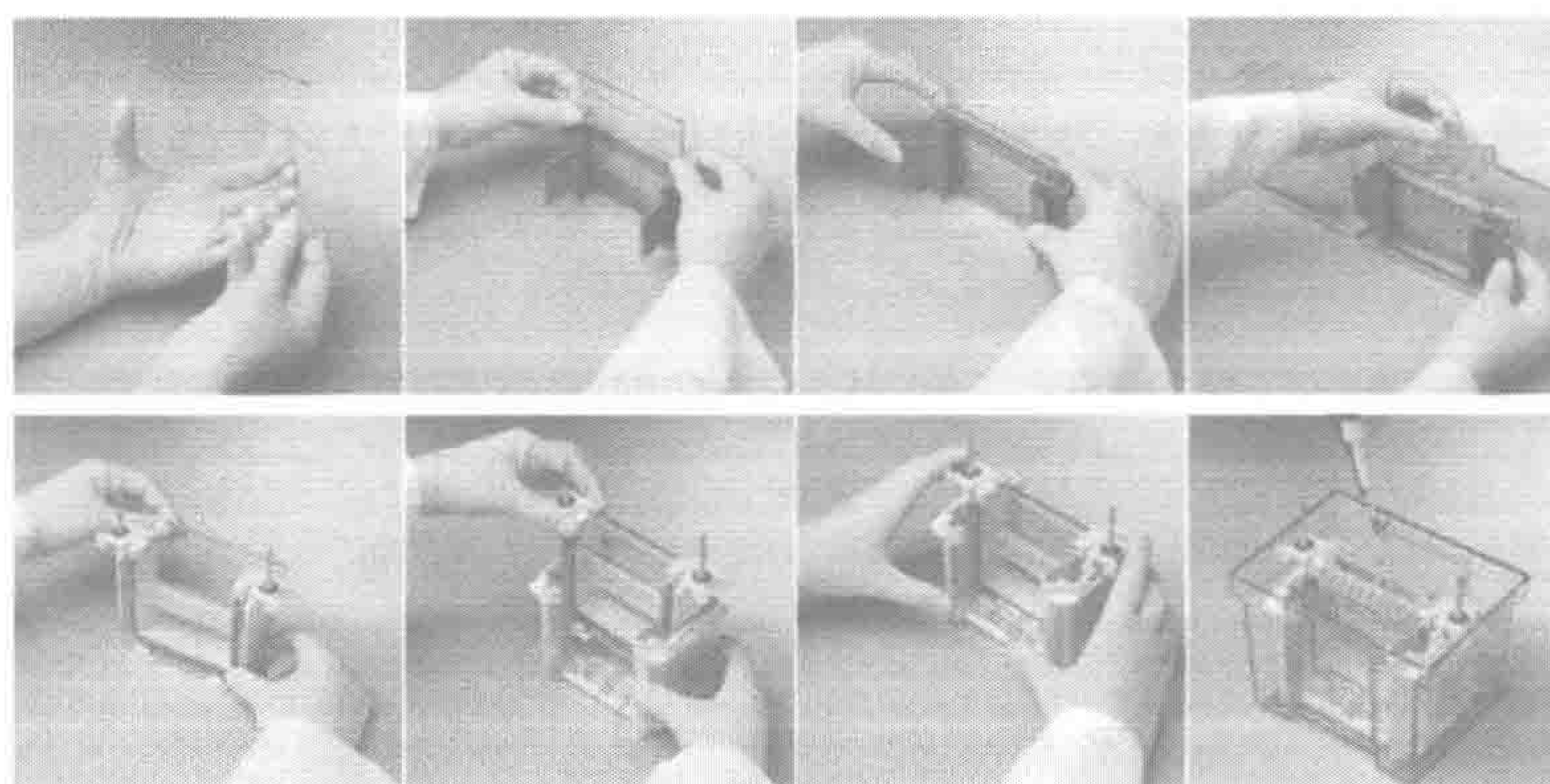


图21-1　Miniprotein Ⅲ 电泳装置操作示意图

4）按表21-2中所列体积配制分离胶10ml（可以灌制2块胶），混匀。

表21-2　不同浓度的SDS-PAGE电泳分离胶配方

贮存液	7.5%	12%	15%
30%丙烯酰胺贮存液	3.3ml	4ml	5ml
4×分离胶缓冲液	2.5ml	2.5ml	2.5ml
去离子水	4.2ml	3.5ml	2.5ml
TEMED	5μl	5μl	5μl
10%过硫酸铵	50μl	50μl	50μl

5）灌制分离胶：使用一根5ml塑料吸管，小心吸取凝胶混合液，沿玻璃板一侧均匀加入两块玻璃板之间，立即覆盖一层水饱和的正丁醇液，大约20min后胶即可聚合。

6）按表21-3体积配制4%浓缩胶3.6ml（两块胶用量），混匀。

表 21-3　SDS-PAGE 电泳浓缩胶配方

贮存液	4%浓缩胶
30%丙烯酰胺贮存液	0.6ml
4×浓缩胶缓冲液	0.9ml
去离子水	2.1ml
TEMED	2μl
10%过硫酸铵	20μl

7）待分离胶凝聚后，可以看到凝胶层与正丁醇液间出现清晰的界面。将玻璃板层倒扣在滤纸上吸干。

8）灌制浓缩胶，插入样品梳，避免在样品梳与凝胶之间出现气泡。如有气泡，可轻轻晃动样品梳将气泡赶出，在室温下大约 20min 后浓缩胶凝聚后，小心拨出样品梳。

9）根据以上方法可以一次灌制多块凝胶，用塑料袋密封后，放入潮湿的密封盒内备用。根据本实验室使用经验，用该方法保存的预制胶，可以在 4℃冰箱内贮存 2 周，电泳分离效果不会发生明显改变。

10）装好电泳系统，加入电极缓冲液，根据需要的样品量用微量注射器，在每个样品孔内上样。

11）设定电泳参数，初始电压调节为 100～120V，电流控制在 15～20mA，当样品中的溴酚蓝指示剂到达分离胶之后，将电压调至 200～220V，45～60min，当溴酚蓝刚跑出分离胶底部时，关掉电泳仪电源，停止电泳。

12）卸下胶板，小心剥离胶进行染色及结果观察（参见本章第二节凝胶染色部分）。

二、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

在采用凝胶电泳分离蛋白质过程中，如果需要对蛋白质的生物学功能进行分析，一般就应该使用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。与变性 SDS-PAGE 电泳技术相比，非变性聚丙烯酰胺凝胶的配制和电泳缓冲液中不能含有变性剂如 SDS 及还原剂，在电泳过程中应该严格控制电泳的温度以防止所分离的蛋白质变性。一般蛋白质进行非变性凝胶电泳要先分清是碱性还是酸性蛋白。分离碱性蛋白时候，要利用低 pH 凝胶系统；分离酸性蛋白时候，要利用高 pH 凝胶系统。酸性蛋白通常在非变性凝胶电泳中采用的 pH 是 8.8 的缓冲系统，蛋白质会带负电荷，向阳极移动；而碱性蛋白通常电泳是在微酸性环境下进行，蛋白质带正电荷，这时候需要将阴极和阳极倒置才可以电泳。

材料与试剂

30 %丙烯酰胺贮存液：取丙烯酰胺 30g，亚甲双丙烯酰胺 0.8g，加重蒸水溶解后，定容到 100ml。过滤后置棕色瓶中，4℃保存，一般可放置 3 个月。注意：丙烯酰胺与亚甲双丙烯酰胺均为神经毒剂，在称取过程中应该戴手套、口罩，在通风橱内进行

4×分离胶缓冲液（1.5mol/L Tris-HCl，pH 8.8）：18.2g Tris 碱溶于 80ml 水，用 1mol/L HCl 调 pH8.8，加水定容到 100ml，4℃贮存

4×浓缩胶缓冲液（0.5mol/L Tris-HCl，pH6.8）：6g Tris 碱溶于 80ml 水，用 1mol/L HCl 调 pH 6.8，加水定容到 100ml，4℃贮存

电泳缓冲液（pH8.8 Tris-Gly 缓冲液）：3.03g Tris 碱，14.4g 甘氨酸，加水定容到 1L，4℃贮存

2×溴酚蓝上样缓冲液：1.25ml pH6.8，0.5mol/L Tris-Cl，3.0ml 甘油，0.2ml 0.5% 溴酚蓝，5.5ml 双蒸水；－20℃贮存

10%过硫酸铵：临用前用双蒸水新鲜配制

TEMED（四甲基乙二胺）原液

步骤

1）装配电泳设备，参见表 21-4 用量，分别配制分离胶及浓缩胶混合液，灌制分离胶及浓缩胶（参见本章第一节）。

表 21-4　SDS-PAGE 电泳凝胶的配制

贮存液	15%分离胶	4%浓缩胶
30%丙烯酰胺贮存液	5ml	0.6ml
4×分离胶缓冲液或 4×浓缩胶缓冲液	2.5ml	0.9ml
去离子水	2.5ml	2.1ml
TEMED	5μl	2μl
10%过硫酸铵	50μl	20μl

2）上样：将玻璃板到电泳槽上。在电泳槽的上、下槽内加入电泳缓冲液，用微量注射将样品缓慢加入上样孔中。

3）电泳：连接电泳，上槽电极为负，下槽电极为正。100V 恒压约 20min，指示剂进入浓缩胶；改换 160V 恒压，当指示剂移动到胶板底部时，停止电泳，整个过程约 80min。

注意事项

1）大多数蛋白质的等电点都在 8.8 以下，因此在上述缓冲液体系中进行电泳时，蛋白质带负电荷，可以得到有效的分离。但有少量碱性蛋白质的等电点大于 8.8，进行非变性凝胶电泳分离时必须采用酸性电泳缓冲液体系。碱性蛋白分离胶缓冲液性：0.06mol/L KOH，0.376mol/L Ac，pH4.3；碱性蛋白质浓缩胶缓冲液：0.06mol/L KOH，0.063mol/L Ac，pH6.8；碱性蛋白质电泳缓冲液：0.14mol/L 2-丙氨酸，0.35mol/L Ac，pH4.5。

2）在分离碱性蛋白质时，电泳时必须将正负电极倒置，用甲基绿（0.002%）为示踪剂。

3）非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后，可以对分离的目的蛋白条带进行回收，以备后续的功能研究。电泳结束以后，根据染色结果切取含有蛋白质的胶带装入处理

过的透析袋中，加入适量的缓冲液，最后把透析袋放入普通的核酸电泳槽中，并在电泳槽中加入适量的缓冲液（和透析袋中的缓冲液相同），低温电泳 2～3h 即可。

三、用于小分子肽分析的 SDS-PAGE

分子质量小于 10kDa 的多肽在常规的采用 Tris-甘氨酸缓冲液凝胶系统中不能被有效分离，而采用 Tris-Tricine 缓冲体系，并提高凝胶交联度，可使小分子多肽在凝胶中得到有效的分离。

材料与试剂

浓缩胶贮存液（49.5%T，3%C）：通风橱中，称取丙烯酰胺 48g，亚甲双丙烯酰胺 1.5g，加双蒸水溶解后，定容至 100ml。置棕色瓶中，4℃保存，一般可放置 3 个月

分离胶贮存液（49.5%T，6%C）：通风橱中，称取丙烯酰胺 46.5g，亚甲双丙烯酰胺 3g，加双蒸水溶解后，定容至 100ml。置棕色瓶中，4℃保存备用

凝胶缓冲液：12.12g Tris 碱 、0.1g SDS 溶于 100ml 水，用 1mol/L HCl 调节 pH 到 8.45

阴极电泳缓冲液：取 Tris 12.12g、Tricine 17.92g、SDS 1g，加水定容至 1L

阳极电泳缓冲液：取 Tris 24.22g，用 5mol/L HCl 调节至 8.9，加水定容至 1L

2×上样缓冲液：0.8g SDS、2.5g（2ml）甘油、10.154g Tris-HCl、0.0012g Tris 碱、0.4ml 2-巯基乙醇、4ml 0.1% 考马斯亮蓝 R250，加双蒸水定容至 10ml，4℃保存备用

步骤

1）装配电泳设备，分别配制分离胶及浓缩胶混合液，灌制分离胶及浓缩胶。

15%分离胶：3.05 ml 49.5% T，6% C 溶液；5ml 分离胶缓冲液；1.9ml 双蒸水；50μl 10% 过硫酸铵；5μl TEMED。

浓缩胶：0.25ml 49.5% T，3% C 溶液；0.75ml 浓缩胶缓冲液；2ml 双蒸水；20μl 10%过硫酸铵；2μl TEMED。

2）电泳操作。准备电泳时，在电泳槽底部加入阳极缓冲液，将制好的胶连同其装置放入电泳槽内，在两块胶之间注入阴极缓冲液，用 30V 的电压预电泳 10min，然后上样。当染料从积层胶进入分离胶后，电压加到 90V，继续电泳直到溴酚蓝抵达分离胶底部，断开电源停止电泳。整个电泳过程应注意控制使用电泳槽温度不超过 40℃。

四、蛋白质的双向电泳

双向凝胶电泳的原理是第一相基于蛋白质的等电点不同用等电聚焦分离，第二向则按分子质量的不同用 SDS-PAGE 分离，把复杂蛋白质混合物中的蛋白质在二维平面上分开。近年来经过多方面改进已成为研究蛋白质组的最有使用价值的标准方法。

材料与试剂

水化上样缓冲液：8mol/L 尿素、2% CHAPS，痕量溴酚蓝，溶解后保存于－20℃

Bio-Lyte 4-6 及 Bio-Lyte 5-7 缓冲液

IPG 预制胶条（pH4～7）

胶条平衡缓冲液：1.5mol/L Tris/HCl，pH8.8，6mol/L 尿素，30% 甘油，2% SDS，痕量溴酚蓝。临用前加入 1% DTT（平衡缓冲液Ⅰ）和 2.5% IAA（平衡缓冲液Ⅱ）

裂解液：8mol/L 尿素，4% CHAPS，40mmol/L Tris，65mmol/L DTT，分装后，贮存于－80℃冰箱

30 %丙烯酰胺凝胶贮液：在通风橱中，称取丙烯酰胺 30g，亚甲双丙烯酰胺 0.8g，加重蒸水溶解后，定容至 100ml。过滤后置棕色瓶中，4℃保存，一般可放置 3 个月。注意：丙烯酰胺与亚甲双丙烯酰胺均为神经毒剂，在称取过程中应该戴手套、口罩，在通风橱内进行

pH 8.9 分离胶缓冲液：Tris 36.3g，加 1mol/L HCl 48ml，加双蒸水 80ml 使其溶解，调节 pH 至 8.9，定容至 100ml，4℃保存

pH6.7 浓缩胶缓冲液：Tris 5.98g，加 1mol/L HCl 48ml，加重蒸水 80ml 使其溶解，调节 pH 至 6.7，定容至 100ml，4℃保存

TEMED（四甲基乙二胺）原液

10%过硫酸铵（用双蒸水新鲜配制）

电泳缓冲液：甘氨酸 43.2g ，Tris 9g ，SDS 3g ，超纯水定容至 2500ml

步骤

1. 第一向等电聚焦

1）从冰箱中取一小管（1ml/管）－20℃冷冻保存的水化上样缓冲液（不含 DTT，不含 Bio-Lyte），置室温溶解。

2）在小管中加入 0.01g DTT，Bio-Lyte 4-6、Bio-Lyte 5-7 各 2.5ml，充分混匀。

3）吸取 400μl 水化上样缓冲液，加入 100μl 样品，充分混匀。

4）从冰箱中取－20℃冷冻保存的 IPG 预制胶条，室温中放置 10min。

5）沿着聚焦盘的边缘自左而右线性加入样品。在槽两端各 1cm 左右不要加样。注意：不要产生气泡，否则影响到胶条中蛋白质的分布。

6）当所有的蛋白质样品都已经加入到聚焦盘中后，用镊子轻轻地去除预制 IPG 胶条上的保护层。

7）轻轻地将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘或水化盘中样品溶液上，使得胶条的正极对应于聚焦盘的正极。确保胶条与电极紧密接触。不要使样品溶液弄到胶条背面的塑料支撑膜上，因为这些溶液不会被胶条吸收。同样还要注意不使胶条下面的溶液产生气泡。如果已经产生气泡，用镊子轻轻地提起胶条的一端，上下移动胶条，直到气泡被赶到胶条以外。

8）在每根胶条上覆盖 2～3ml 矿物油，防止胶条水化过程中液体的蒸发。需缓慢

的加入矿物油，沿着胶条，使矿物油一滴一滴慢慢加在塑料支撑膜上。

9）对好正、负极，盖上盖子。设置等电聚焦程序。

10）聚焦结束的胶条。立即进行平衡及第二向 SDS-PAGE 操作，否则将胶条置于样品水化盘中，－20℃冰箱保存。

2. 第二向 SDS-PAGE

1）配制 10%的丙烯酰胺凝胶两块。配 80ml 凝胶溶液，每块凝胶 40ml，将溶液分别注入玻璃板夹层中，上部留 1cm 的空间，用水饱和正丁醇封面，保持胶面平整。聚合 30min。一般凝胶与上方液体分层后，表明凝胶已基本聚合。待凝胶凝固后，倒去分离胶表面的水饱和正丁醇，用 MilliQ 水冲洗。

2）配制浓缩胶（$T=4.8\%$ 10ml）：30%丙烯酰胺储液 1.6ml、浓缩胶缓冲液 2.5ml 10%APS 30μl、TEMED 5μl、双蒸水 5.9ml，混匀后注入分离胶上部，使其凝固。

3）从－20℃冰箱中取出的胶条，先于室温放置 10min，使其溶解。

4）将胶条转移至溶胀盘中，每个槽一根胶条，在有胶条的槽中加入 5ml 胶条平衡缓冲液Ⅰ。将样品盘放在水平摇床上缓慢摇晃 15min。

5）第一次平衡结束后，彻底倒掉或吸掉样品水化盘中的胶条平衡缓冲液Ⅰ。并用滤纸吸取多余的平衡液（将胶条竖在滤纸上，以免损失蛋白质或损坏凝胶表面）。再加入胶条平衡缓冲液Ⅱ，继续在水平摇床上缓慢摇晃 15min。

6）第二次平衡结束后，彻底倒掉或吸掉样品水化盘中的胶条平衡缓冲液Ⅱ。并用滤纸吸取多余的平衡液（将胶条竖在滤纸上，以免损失蛋白质或损坏凝胶表面）。用镊子夹住胶条的一端使胶面完全浸没在电泳缓冲液中。

7）将平衡好的 IPG 胶条贴靠在玻璃板上，加少量的 5%的琼脂糖溶液在胶面上（琼脂糖凝胶在转移前十几分钟的时候配，微波炉内加热溶解，并保持烧杯中水处于沸腾状态，至用前再拿出来），再将 IPG 胶条缓缓加入 SDS-PAGE 胶面，其中不断补加 5%的琼脂糖溶液，注意不能产生气泡。

8）放置 5min，使低熔点琼脂糖封胶液彻底凝固。在低熔点琼脂糖封胶液完全凝固后，将凝胶转移至电泳槽中。

9）在电泳槽中加入电泳缓冲液后，接通电源，起始时用的低电流（5mA/gel/17cm），待样品在完全走出 IPG 胶条，浓缩成一条线后，再加大电流（或电压）(20～30mA/17cm 胶)，待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。

10）电泳结束后，轻轻撬开两层玻璃，取出凝胶，进行凝胶染色及扫描。

第二节　蛋白质凝胶电泳染色及检测技术

一、考马斯亮蓝染色

在蛋白质染色方法中，目前以考马斯亮蓝染色方法最为常用。考马斯亮蓝分子中含

有多个 SO_3H 基团，可以与蛋白质的碱性基团结合而使蛋白质分子显色。该染色方法操作简便，所需时间短，可以检测最低 1μg 的蛋白条带。

材料与试剂

染色液：称 100mg 考马斯亮蓝 G250，溶于 200ml 蒸馏水中，慢慢加入 7.5ml 70% 的过氯酸，最后补足水到 250ml，搅拌 1h，小孔滤纸过滤

脱色液：用量筒取 250ml 95%乙醇、80ml 冰乙酸，用双蒸水定容至 1000ml

步骤

1）电泳结束后，取胶放入适量考马斯亮蓝染色液中，微波炉加热至接近沸腾或刚刚沸腾，立即停止加热。

2）通常胶浓度大于 10%的胶比较坚韧，在发生煮沸时不易破损；胶浓度小于 10%的胶，宜尽量避免煮沸，以免出现胶碎裂的情况。

3）随后在染色液温度较高的情况下，在室温摇床上摇动 5～10min。

4）倒出染色液。染色液可以回收重复使用至少 2～3 次。

5）加入适量考马斯亮蓝染色脱色液，确保染色液可以充分覆盖凝胶。微波炉加热至接近沸腾或刚刚沸腾，立即停止加热。

6）随后在脱色液温度较高的情况下，在摇床上摇动 5～10min。此时通常可以观察到比较清楚的蛋白质条带。

7）更换新鲜的脱色液，重复步骤 6)和步骤 7)，直至蓝色背景基本上全部被脱去，蛋白质条带染色效果达到预期。

8）完成脱色后，可以把凝胶保存在水中，用于后续的拍照等。保存在水中的凝胶会发生溶胀。如需避免溶胀，可以把胶保存在含 20%甘油的水溶液中。

二、SDS-PAGE 银染方法

蛋白质条带的银染是基于蛋白质中各种基团（如含硫氨基酸及碱性氨基酸）与银离子的结合，在碱性条件下，银离子可以被甲醛还原成金属银而显色。银染的检测灵敏度较高，最低可检测 2～5.0ng 的蛋白条带，比考马斯亮蓝染色灵敏度高 100 倍以上。

材料与试剂

固定液：35ml 乙醇，10ml 冰乙酸，55ml 去离子水

增敏液：3.28g 乙酸钠，0.1g 硫代硫酸钠，60ml 加去离子水，0.4ml 冰乙酸，溶解后加入 33ml 乙醇，2ml 戊二醛（使用前加入）

银染液：硝酸银 0.1g，去离子水 100ml，临用前加入甲醛 200μl

终止液：冰乙酸 5ml，加入去离子水 95ml

步骤

1）电泳结束后，打开模具，取出凝胶。

2）用固定液固定蛋白质 1h 以上或过夜。

3）去除固定液后，将凝胶浸泡在 20ml 增敏液中，置水平摇床上轻摇 30min，然后用去离子水清洗 2 次，每次 5min。

4）将凝胶浸泡在 20～100ml 银染色工作液中，置水平摇床上轻摇 30min，然后用去离子水漂洗 2 次，每次 1min。
5）将凝胶浸泡在 20ml 显色工作液中，置水平摇床上轻摇，同时观察显色的效果，一般 1～5min 就能看到清晰的条带，若得到满意的结果应立即进行步骤 6）操作。
6）用染色终止液清洗凝胶，置水平摇床上轻摇 10min，终止显色反应。
7）终止显色反应后，用去离子水清洗凝胶，置水平摇床上轻摇 10min；取下凝胶进行照相或置于干胶机上干燥后保存。

三、蛋白质凝胶电泳的荧光染色

目前常用于蛋白质凝胶电泳检测的荧光染料主要有 SYPRO Ruby™染料和 Deep-Purple™两种，均为非特异性的荧光分子，对所有蛋白质分子均可产生非共价结合。使用荧光染料可使糖蛋白、脂蛋白、钙结合蛋白、纤维蛋白和其他难以染色的蛋白质染色，且不影响蛋白质的后续分析如 Edman 测序或质谱分析等。

材料与试剂

双向聚丙烯酰胺凝胶 SYPRO Ruby 染色用固定液

10％甲醇

7％冰乙酸

步骤

1）将凝胶转至干净的染色皿中并用 10％甲醇（或乙醇）/7％乙酸溶液清洗 30min，聚丙烯酰胺凝胶清洗一次即可，IEF 凝胶则需清洗 3 次。
2）将凝胶转移至适当大小的聚丙烯或 PVC 平皿中，加入未经稀释的适量 SYPRO Ruby 蛋白凝胶染色液，连续温和振荡。为获得较好的染色效果，单向或双向聚丙烯酰胺凝胶一般需温育 3h 以上，而 IEF 凝胶则需温育过夜。
3）如需将染色后的凝胶保存，可将凝胶置于 2％（体积比）甘油中室温下孵育 30min，用干胶仪使染色好的凝胶干燥。
4）将凝胶拍照并观察结果。

四、聚丙烯酰胺凝胶上磷酸化蛋白质的特异性荧光染色

蛋白质的磷酸化修饰是生物体内重要的共价修饰方式之一，在哺乳动物细胞生命周期中，大约有 1/3 的蛋白质发生过磷酸化修饰蛋白质磷酸化。细胞内多种生物学活性的发挥依赖于特定蛋白质的磷酸化。采用特殊的凝胶染色剂，可以特异性地对凝胶中的磷酸化蛋白进行染色，然后在激发光的照射下，发出特定的发射光。目前已经有商品化的磷酸化蛋白检测试剂盒，可以检测出 1ng 水平的磷酸化蛋白条带。采用该技术检测蛋白质磷酸化时，染色信号强度与磷酸基团的数量呈正相关。

材料与试剂

磷酸化蛋白标准品

蛋白磷酸化染色用固定液：10% 三氯乙酸，50% 甲醇的纯水溶液

Pro-Q Diamond 磷蛋白凝胶染色液（Molecular Probes）

蛋白磷酸化染色用脱色液：50ml 1mol/L 乙酸钠，pH4.0，750ml Mili Q 纯水，200ml 乙腈

步骤

1）凝胶电泳结束后，将凝胶转移至一洗净的染色平皿中，用 100ml 左右磷蛋白染色用固定液将凝胶浸没，在室温下温和振荡至少 30min。例如，在 50r/min 转速的旋转摇床上孵育。若有需要，重复固定，将凝胶上的 SDS 去除干净，或者固定过夜。

2）将凝胶在 100ml 左右水中温和振荡 10min，重复清洗 1 次。

3）将凝胶置入 50ml Pro-Q Diamond 磷蛋白凝胶染色液中，避光孵育 75～120min。

4）弃染色液后，在室温下将凝胶置于 100ml 磷蛋白凝胶脱色液中避光孵育 1h 后，更换脱色液。共孵育 3 次。

5）观察染色结果，用适当的仪器将凝胶扫描成像并存档。

五、糖基化蛋白和非糖基化蛋白的差异性荧光染色

糖基化作为重要的翻译后加工过程，对蛋白质的正确折叠、定位、抗原性以及生物学活性有很大的影响。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，可以通过特异的差异性荧光染色试剂盒，对蛋白质的糖基化进行检测。目前有商品化的 Pro-Q Elmerald 糖蛋白凝胶染色试剂盒，检测范围为 0.5ng 糖蛋白每条带。其检测原理均基于 PAS 法。PAS 反应是指在过碘酸的作用下，糖蛋白中糖链上相邻两个碳原子上的羟基被氧化成醛基，醛基再与带有紫外或荧光物质的氨基形成 Schiff 碱。利用紫外或荧光激发进行检测。

材料与试剂

Pro-Q Elmerald 糖蛋白凝胶染色试剂盒（Molecular Probes）包括：Pro-Q Elmerald 300 染色试剂（组分 A），50×浓缩液于 DMF 中保存（－20℃避光保存可使用 6 个月）；Pro-Q Elmerald 300 染色缓冲液（组分 B，在室温下保存可使用 6 个月）

氧化剂（组分 C）：2.5g 高碘酸 [加入 250ml 3%（体积比）乙酸，在室温下保存可使用 6 个月]

CandyCane 糖蛋白分子质量标准品（－20℃保存可使用 6 个月）

固定液：50%（体积比）甲醇

洗涤液：3%（体积比）冰乙酸

步骤

1）电泳结束后，将凝胶转移至聚苯乙烯染色皿中，用 100ml 固定液将凝胶浸没，在室温下温和振荡（如用 50r/min 转速的旋转摇床孵育）45min。

2）用 50ml 洗涤液温和振荡凝胶 10min，重复 1 次。

3）用 25ml 氧化剂孵育凝胶 30min 以氧化糖类。

4）用 250ml 洗涤液清洗凝胶，温和振荡 5～10min，重复 3 或 4 次。

5）在使用前，将 Pro-Q Elmerald 300 染色试剂 50×浓缩液 50 倍稀释于 Pro-Q Elmerald 300 染色缓冲液中，用 25ml 染色液避光染色，温和振荡 1.5～2h。

6）在室温下用 50m 洗涤液清洗凝胶 15min，重复 1 次，但不能超过 2h，因为长时间置于洗涤液中会使已染色的凝胶开始脱色。

7）将染色状态下的凝胶成像观察并保存。

（陈国友）

参 考 文 献

夏其昌，张祥民，周仲驹，等. 2007. 蛋白质电泳技术指南. 北京：化学工业出版社.

Dunn MJ. 1987. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. J Chromatogr，418：145～185.

Rabilloud T. 2000. Detecting proteins separated by 2-D gel elctrophorresis. Anal Chem，72：48A～55A.

Schagger H，Von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. Anal Biochem，166：368～379.

第二十二章 蛋白质印迹

第一节 概 述

印迹法是指将蛋白质或核酸样品转移到固相载体上，再利用相应的检测手段来检定样品的一种方法。1975 年，Southern 创立了将 DNA 转移到硝酸纤维素膜（NC）上，并利用 DNA-RNA 杂交检测特定的 DNA 片段的方法，称为 Southern 印迹法。后来人们用类似的方法，对 RNA 和蛋白质进行了印迹分析，对 RNA 的印迹分析称为 Northern 印迹法，对单向电泳后的蛋白质印迹分析称为 Western 印迹法（Western blot），对双向电泳后蛋白质分子的印迹分析称为 Eastern 印迹法。将 Western 印迹法引入免疫学研究，抽提组织或细胞中的蛋白质样品，先行 SDS-PAGE，转移至膜固相载体上，选择特异性抗体进行抗原抗体反应，接着行化学发光检测，可以鉴定蛋白质并同时比较多个样品同种蛋白的表达量差异，称为蛋白质印迹（immunoblotting test，IBT）。

蛋白质印迹法具有适用性广、分析容量大、敏感度高、特异性强等优点，几乎所有蛋白质都可用于蛋白质印迹；也是检测蛋白质特性、表达与分布的一种最常用的方法。

蛋白质印迹法将抗原抗体反应与化学发光反应结合起来，通过级联放大效应可检测出 0.01ng 水平的蛋白质样品。如检测含量特别稀有的蛋白质，在进行凝胶电泳前要进行免疫共沉淀或亚细胞分离等方法富集蛋白。

蛋白质印迹中的关键因素就是抗原分子中可被抗体识别的表位性质。实验中第一抗体尽量选择小鼠来源的特异性单抗；但多数高分辨力凝胶电泳会导致抗原样品的变性，而多克隆抗体中会往往能识别致耐受性表位，所以在蛋白质印迹实验中如单克隆抗体不能与变形抗原反应，可用多克隆抗体代替。

蛋白质印迹中常用的膜载体有硝酸纤维素膜（nitrocellulose membrane，NC）、DBM 膜（diazobenzyloxymethyl）、DPT 膜（diazophenylthiaether）、尼龙膜和 PVDF 膜（polyvinylidene fluoride）。NC 膜曾是最常用的膜，结合蛋白质含量大（250μg/cm^2），但它与蛋白质非共价结合后易碎。尼龙膜柔韧性好，结合蛋白质牢固，但容量小（150μg/cm^2）且背景深。PVDF 膜柔韧性好，结合蛋白质牢固，结合容量较大（200μg/cm^2），已是目前最常用的膜载体。

第二节 Western 印迹法

Western 印迹又称为蛋白质印迹，由美国斯坦佛大学的 George Stark 所建立，历经 20 多年的发展完善，已经成为免疫学研究中蛋白质分析的常用实验方法。

与 Southern 印迹或 Northern 印迹方法类似，Western 印迹是针对蛋白质样品的印迹杂交分析，采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品，待测抗原是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗。经过 SDS-PAGE 分离的蛋白质样品，被转移到膜载体上，以非共价键吸附于膜上。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体发生免疫反应，再与经酶或同位素标记的第二抗体，形成抗原-抗体-标记第二抗体的复合物，经过底物显色或放射自显影以检测特异性蛋白。

Western 印迹程序通常分为 5 个步骤：①抗原样品的制备；②凝胶电泳分离样品；③转移分离的蛋白质至膜上；④标记抗原；⑤抗原的显色分析。

在 Western 印迹中需要使用内参，在检测目的产物的同时检测内参的表达，由于内参在各组织和细胞中的表达相对恒定，借助检测每个样品内参的量就可以用于校正上样误差，由此得到的结果更为可信。内参也可以作为空白对照，检测蛋白转膜情况是否完全、整个 Western 印迹显色或者发光体系是否正常。常用的蛋白质内参有 GAPDH 和细胞骨架蛋白 β-actin。通常选择一个在实验处理因素作用下含量不会发生改变的蛋白质作内参。

依据标记抗体方法的不同，Western 印迹的显色方法分为以下几种：①采用放射性核素（^{3}H、^{32}P、^{35}S）标记的放射自显影法；②采用荧光素（FITC）标记的底物荧光 ECF 法；③采用酶（HRP、AKP）和生物素标记的底物生色法。目前常用的方法是采用 HRP 标记抗体，结合化学发光方法显色。

Western 印迹将电泳分离、抗原抗体反应与化学发光反应技术结合起来，具有凝胶电泳分辨率高、固相免疫测定特异性强、敏感度好的共同效应；可以同时检测多种样品，重复性好，可靠性佳，是当前鉴定蛋白质抗原、检测样品中特异抗原的分布、表达水平的经典方法。经典的 Western 印迹主要用于定性和半定量分析，但近来改进的 Western 印迹方法已经可以进行定量分析。

一、印迹样品制备

（一）细胞抗原和组织抗原样品的制备

1. 细胞抗原的处理方法

向收集到的细胞中加入 RIPA 裂解缓冲液（蛋白酶抑制剂在使用前加入，终浓度为 2μg/ml）在冰上裂解 30～60min，然后再插入冰盒进行超声，超声强度以不产生泡沫为宜，超声每次 2～3s，重复 3 或 4 次，12 000g 离心3～5min，吸取上清备用。

2. 组织抗原的处理方法

将组织从动物体内取出（样品不宜反复冻融），取少量（1～2g）放入玻璃匀浆器中研磨成匀浆，然后转入微量离心管中进行超声，超声强度以不产生泡沫为准，超声每次 5～7s，重复 5 或 6 次，再 12 000r/min，离心 3～5min，吸取上清备用。

上述两种方法得来的样品处理液还要加入 1/4 体积左右的电泳上样缓冲液，然后放在沸水浴中加热 3～4min 使蛋白质变性，方可作为样品准备行凝胶电泳。注意：在加热组织裂解液时，肝脏和肾脏组织要特别注意其本身浓度，最好是在制作裂解液时就适

当稀释，否则加热后会凝结成固态。还有些组织处理后很黏稠，有带丝状物，这是未裂解的核酸，可以适当离心后再用。

（二）其他样品的制备

细菌抗原、分泌上清样品、经抽提纯化的蛋白质样品可以直接加入电泳上样缓冲液，然后在沸水浴中加热 3～4min 使蛋白质变性后。

二、SDS-PAGE

方法具体参见第二十一章。

三、蛋白质转膜

膜的选择主要从实验目的和实验要求来考虑。例如，检测分子质量小于 20kDa 的蛋白质，不能使用 0.45μm 的 NC 膜，因为这样可能会使得蛋白因透过膜孔而造成膜结合的目的蛋白量缺失，从而影响最终结果。如果所分离的蛋白质需要进行测序，则必须使用 PVDF 膜，因为只有 PVDF 膜才能耐受严酷的清洗条件。常用的 Western 用膜有 NC 膜、PVDF 膜和尼龙膜，它们的一些主要的特点总结如表 22-1 所示。

表 22-1 Western 印迹常用膜性质比较

名称	NC 膜	尼龙膜	PVDF 膜
灵敏度和分辨率	高	高	高
背景	低	较高	低
结合能力	80～110μg/cm^2	>400μg/cm^2	125～200μg/cm^2（适合于 SDS 存在下与蛋白质的结合）
材料质地	干的 NC 膜易脆	软而结实	机械强度高
溶剂耐受性	无	无	有
操作程序	缓冲液润湿，避免气泡	缓冲液润湿	使用前 100%甲醇润湿
检测方式	常规染色，可用放射性和非放射性检测	不能用阴离子染料	常规染色，比较于 NC 膜，可用考马斯亮蓝染色，可用于 ECL 检测，快速免疫检测
适用范围	0.45μm 一般蛋白质	低浓度小分子蛋白质、酸性蛋白、糖	糖蛋白检测和蛋白质测序
价格	较便宜	便宜	较贵

（一）湿法转膜

电泳转膜常用两种方法：一种是上述的方法，也称为湿转；另一种就是半干转移。湿转与半干转移原理相同，只是用于固定胶/膜叠层和施加电场的机械装置不同。湿转是一种传统方法，将胶/膜叠层浸入缓冲液槽然后加电压。这是一种有效方法但比较慢，需要大体积缓冲液且只能用一种缓冲液。

材料与试剂

电泳仪，垂直电泳槽，转移电泳槽，摇床，滤纸

转移缓冲液：700ml 双蒸水中溶解 3.03g Tris、14.4g 甘氨酸，200ml 甲醇，补足双蒸水至 1L

丽春红染液：0.05g 丽春红 S，100μl 冰乙酸，加水至 10ml，使用后应予以废弃

步骤

1）平衡凝胶：用转膜缓冲液平衡、漂洗凝胶，10min×3 次。

2）戴上手套，准备好滤纸和 PVDF 膜（裁剪滤纸和膜，使膜大小与凝胶相同，滤纸比凝胶稍大），尽量避免污染滤纸和膜，将裁减好的滤纸和膜浸泡于电泳转移缓冲液中，驱除留于膜上的气泡。

3）打开转移盒并放置浅盘中，用转移缓冲液将海绵垫完全浸透后将其放在转移盒壁上，海绵上再放置一张浸湿的滤纸。

4）转膜装置依次按“阳极筛孔板-海绵-滤纸-PVDF 膜-凝胶-滤纸-海绵-阴极筛孔板”的顺序装置好，注意不能有气泡且装置电极槽不能放反（转膜夹层组合见图 22-1）。

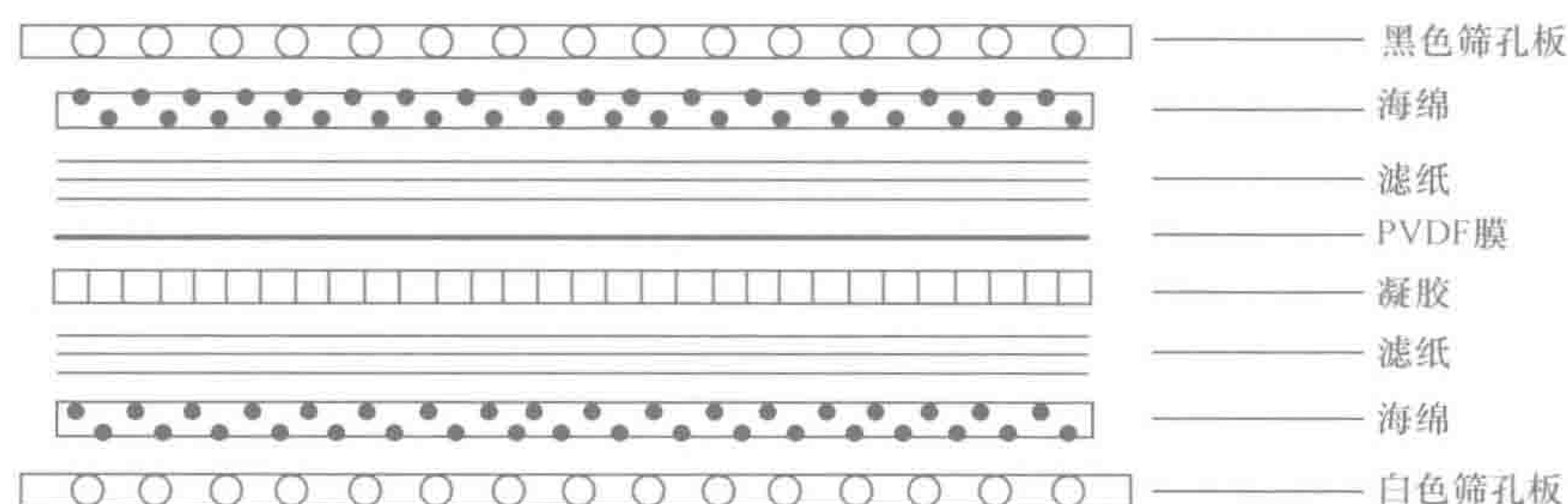


图 22-1　转膜组合次序示意图

5）将冰盒装入缓冲液槽，注满 4℃预冷的转移缓冲液。

6）将整个装置放在冰浴中用磁力搅拌器搅拌，连接好转移电极，恒流 0.11～0.20A，转移 2～4h。电转完毕后，将 PVDF 膜上含有蛋白 Marker 的条带切下，置于丽春红 S 染液中染色 10～20min，观察有无条带显现，如有可证明转膜成功。也可以使用显色的预染 Marker，如转膜成功则膜上会显现相应的 Marker 条带。

7）剪角标记膜的方向，自然干燥。干燥的膜可在 4℃保存一年。如直接进行免疫染色，可不干燥，继续进行免疫标记。

注意事项

1）使用 PVDF 膜的时候需要进行预处理，用甲醇充分润湿膜，注意膜上不能沾染油脂，否则会影响蛋白质结合和抗体杂交。

2）滤纸/凝胶/转印膜/滤纸夹层组合中不能存在气泡，可用玻璃棒在夹层上滚动将气泡赶出，以提高转膜效率。

（二）半干转移

半干转移，用浸透缓冲液的多层滤纸代替缓冲液槽。与湿转相比，耗时较短。半干转移需要响应的电转移仪。其转移效率与凝胶厚度、浓度、蛋白质的分子质量、形状与带电荷情况有关。

材料与试剂

半干电转印仪，滤纸

转移缓冲液：700ml 双蒸水中溶解 3.03g Tris、14.4g 甘氨酸，200ml 甲醇，补足双蒸水至 1L

丽春红染液：0.05g 丽春红 S，100μl 冰乙酸，加水至 10ml，使用后应予以废弃

步骤

1）转移缓冲液浸泡平衡凝胶、膜和滤纸，时间≥30min。

2）转膜装置从下至上依次按阳极碳板、3 层厚滤纸、PVDF 膜、凝胶、3 层厚滤纸、阴极碳板的顺序放好，滤纸、凝胶、PVDF 膜精确对齐，每一步均需去除气泡，将碳板上多余的液体吸干。

3）用支架夹紧上述各层，置电转移槽中，PVDF 膜一侧靠正极，凝胶一侧靠负极。接通电源，低电压恒定电流，转移电压不超过 $0.8mA/cm^2$，恒流 0.10～0.20mA，转移 1～2h。转移时间长短依靶蛋白分子质量大小来调节。

4）电转完毕后，将 PVDF 膜上含有蛋白 Marker 的条带切下，置于丽春红 S 染液中染色 10～20min，观察有无条带显现，如有可证明转膜成功。也可以使用显色的预染 Marker，如转膜成功则膜上会显现响应的 Marker 条带。

四、蛋白质标记

先后采用第一抗体和第二抗体标记蛋白，形成蛋白质样品-一抗-二抗复合物，其中第一抗体是直接与蛋白抗原结合的特异性抗体，第二抗体是酶标记的抗抗体。

一抗的选择是影响蛋白质印迹成败的主要因素。多克隆抗体结合抗原能力较强、灵敏度高，但易产生非特异性的背景；单克隆抗体识别抗原特异性较好，但可能不识别在样品制备时因变性而失去了空间构型的抗原表位，且易发生交叉反应。因此，近年来兼有多克隆抗体和单克隆抗体优点的混合单克隆抗体受到了关注，它是由一组能与抗原分子中的不同抗原表位结合并不易出现交叉反应的单克隆抗体混合构成。

材料与试剂

托盘，摇床

10×TBS（pH7.4）：800ml 双蒸水中 Tris 121.14g，NaCl 87.66g，加入 1mol/L HCl 64ml，补足水至 1000ml

1×TBST（pH7.4）：取 10×TBST 贮存液 100ml，双蒸水 900ml，Tween 20 1ml

封闭液：5g 脱脂奶粉溶于 100ml 1×TBST 中

用封闭液配制的第一抗体

HRP 标记的第二抗体（抗第一抗体）

步骤

1）用封闭液配制第一抗体溶液（按照抗体性质选择合适稀释比例），将转印膜放入第一抗体溶液作用 2h（室温）或 4℃过夜。

2）弃第一抗体溶液，用 1×TBST 漂洗转印膜，15min×4 次。

3）加入 TBST 配制的 HRP 偶联的二抗溶液（按照抗体性质选择合适稀释比例），室温作用 1～2h。

注意事项

1）一抗、二抗的浓度一般要参照抗体说明书选择最适当的比例，一抗、二抗的选择直接影响实验结果以及背景的深浅。在正式实验前需做预实验确定一抗和二抗的反应浓度。

2）封闭时一般在室温下 2h 就够了，但是要注意如果是生物素标记的二抗就不宜用牛奶，因为牛奶中含有生物素，用 BSA 效果更好。

3）二抗不要使用叠氮化钠作防腐剂，因为叠氮化钠是 HRP 的抑制剂。

五、蛋白质显色

依据标记抗体方法的不同，Western 印迹法的显色方法分为以下几种：①采用放射性核素（^{3}H、^{32}P、^{35}S）标记的放射自显影法；②采用荧光素（FITC）标记的底物荧光 ECF 法；③采用酶（HRP、AKP）和生物素标记的底物生色法。目前常用的方法是采用 HRP 标记抗体，结合化学发光方法显色。

1. HRP 显色

HRP 是最常见的酶促发光或显色酶，对于底物的选择，主要考虑的是灵敏度、背景和使用的方便性和稳定性。对于 HRP 的这几种显色底物的各种性能的比较见表 22-2。

表 22-2　HRP 不溶性底物性质比较

底物	DAB	4CN	AEC	TMB
名称	二氨基联苯胺	4-氯-1-萘酚	氨乙基卡唑	四甲基联苯胺
相对分子质量	214.14	178.58	210.28	240.41
稳定性	好	较差	差	好
灵敏度	0.1ng	1ng	—	0.1ng
背景	较低	低	高	高
成像	易成像	易成像	成像较难	易成像
颜色	棕黑色	紫色	棕红色	紫黑色
毒性	致癌作用	无	有	无

近年来 HRP 的化学发光底物 ECL 得到了越来越多的应用。常见的化学发光底物包括经典的 Luminol、GE Healthcare 的 ECL 系列，还有 Pierce 公司的 Super Signal 系列等。GE Healthcare 公司推出的 ECL Plus 和 ECL Advance 检测灵敏度高，发光时间

也长达 24h 以上。Pierce 公司的 SuperSignal 灵敏度高，发光持久（6～24h），且可反复曝光，稳定性好。

辣根过氧化物酶 HRP 的底物用 DAB/CN，临用前新鲜配制，用 1ml 甲醇溶解 6mg CN（4-chloro-1-naphthol）；用 1ml 甲醇溶解 2mg DAB；两溶液相混合，补足 PBS 至 10ml，混合液中加入 10μl 30% H_2O_2。将膜放入显色液中避光显色 10～30min，终止反应，采用凝胶发光成像仪进行分析。

HRP 的显色也可以采取底物发光法：将两种显色底物按 1∶1 等体积混合后将其均匀覆盖在膜表面，用玻璃胶片包裹膜，紧接着在暗室中将 X 射线胶片覆压在膜上，根据信号的强弱适当调整曝光时间，一般为 1～5min，也可选择不同时间多次压片，以达到最佳效果；曝光完成后，打开 X 射线胶片夹，取出 X 射线胶片，迅速浸入显影液中显影，待出现明显条带后，即刻终止显影。显影时间一般为 1～2min（20～25℃），温度低于 16℃时需适当延长显影时间；显影结束后，马上把 X 射线胶片浸入定影液中，定影时间一般为 5～10min，以胶片透明为止；用水冲去残留的定影液，室温下晾干。

HRP 的底物还有 TMB、AEC 等。上述酶的底物酶解后均产生不溶性有色产物沉积显示酶的存在，而 ELISA 所用的 OPD 产生底物是可溶性的。

注意事项

1）如果出现非特异性的高背景，可先观察仅用二抗单独处理转印膜所产生的背景强度，如果高背景由二抗产生，可适当降低二抗浓度或缩短二抗孵育时间；并考虑延长每一步的清洗时间。

2）使用化学发光检测时，试剂须按需要量临用前配置混合。

3）使用 X 射线胶片检测化学发光时不易控制曝光强度，因此有条件可选用化学发光成像扫描系统进行精确定时连续检测，以得到最好信噪比的图像进行定量分析。

4）在显色发光时要特别注意二抗所对应的显色方法，特别是在发光时要注意发光时间和显影时间的控制，以目的条带显示清晰为标准。

5）DAB 有潜在的致癌可能，操作时要小心，避免沾染。

2. AKP 显色

碱性磷酸酶（AKP）的底物是 BCIP/NBT，也是临用前新鲜配制，70%二甲基甲酰胺配制 50mg/ml BCIP，100%二甲基甲酰胺配制 50mg/ml NBT，AKP 的缓冲液是 TNM（0.1mol/L Tris/HCl，pH9.0，0.1mol/L NaCl，0.01mol/L $MgCl_2$），10ml TNM 中溶入 33μl BCIP，17μl NBT，反应后产生靛青色沉淀，灵敏度高。氨基苯二酰肼是 AKP 的另一种反应底物，反应后产生暗灰色沉淀。

第三节　斑点印迹法

斑点印迹法又称为 dot blot，是将蛋白质抗原样品直接点样于膜固相载体上，然后加入抗体形成抗原抗体结合反应，利用酶联发光或显色原理将结果显示到膜或底片上，

进行抗原的免疫化学方法。根据所用的标记物不同，可分为辣根过氧化物酶免疫斑点试验（使用辣根过氧化物酶作为抗抗体的标记物）、碱性磷酸酶免疫斑点试验（使用碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶复合物作为酶标记物）和金染色免疫斑点试验（使用胶体金作为抗抗体的标记物）等。其中，最常用的是以辣根过氧化物酶标记系统为基础的免疫斑点试验。

斑点印迹法是蛋白质印迹法的一种，具有微量、快速、经济、方便等特点，没有转印效率的干扰，可同时检测多个样品，因此该方法常用特定抗原的半定量筛查，可用于基因工程中筛选阳性重组克隆，也可作为 Western 印迹法的预实验。

材料与试剂

PVDF 膜。

10 ×TBS（pH7.4）：800ml 双蒸水中 Tris 121.14g，NaCl 87.66g，加入 1mol/L HCl 64ml，补足水至 1000ml

1×TBST（pH7.4）：取 10×TBST 贮存液 100ml，双蒸水 900ml，Tween 20 1ml

封闭液：5g 脱脂奶粉溶于 100ml 1×TBST 中

鼠抗人第一抗体

HRP 标记的兔抗鼠第二抗体

HRP 底物 DAB 及显色指示剂原液

步骤

1）用微量加样枪将抗原溶液 1～2μl 直接滴于 PVDF 膜上，室温下晾干。

2）用 1×TBST 洗涤膜，20min×3 次。

3）加入封闭液（5%脱脂奶粉），浸泡转印膜，室温或 37℃（平缓摇动）反应 1～3h，以封闭转印膜上一些非特异性蛋白质的潜在结合位点，避免非特异性反应。

4）弃封闭液，用 1×TBST 洗涤转印膜，10min×3 次。

5）用封闭液配制第一抗体溶液（按照抗体性质选择合适稀释比例），将转印膜放入第一抗体溶液作用 2h（室温）或 4℃过夜。

6）弃第一抗体溶液，用 1×TBST 漂洗转印膜，15min×4 次。

7）加入 TBST 配制的 HRP 偶联的二抗溶液（按照抗体性质选择合适稀释比例），室温作用 1～2h。

8）弃二抗溶液，用 1×TBST 漂洗转印膜，15min×4 次。

9）洗涤转移膜后，在底物液中显色 10～30min，观察显色结果。显色完成后，用双蒸水大量冲洗以终止反应。

辣根过氧化物酶 HRP 的底物用 DAB/CN，临用前新鲜配制，用 1ml 甲醇溶解 6mg CN；用 1 ml 甲醇溶解 2mg DAB；两溶液相混合，补足 PBS 至 10ml，混合液中加入 10μl 30% H_2O_2。将膜放入显色液中避光显色 10～30min，终止反应，采用凝胶发光成像仪进行分析。

注意事项

1）通常点样抗原的蛋白质含量不宜超过10μg，上样体积也不要超过10μl，否则加样过多造成样品延伸，可使邻近样品相混。

2）注意各样品均匀点样，使各样品在膜上均匀分布，扩散面积相近。

3）第一抗体和酶标记的第二抗体的工作浓度对试验成功与否至关重要。最适浓度常与上样抗原浓度有关，应根据试验条件进行预实验探索最佳的工作浓度。

4）操作时戴手套操作，减少非特异性污染。

5）显色时间一般为5～10min。显色时间过长常导致本底着色加深，降低反应的特异性。

6）实验中需要用不含抗原的缓冲液作为阴性对照。

（张　意）

参考文献

沈关心，周汝麟，王庆. 2002. 现代免疫学实验技术. 第二版. 武汉：湖北科学技术出版社，554～555.

Bronstein I, Voyta J, Murphy O, et al. 1992. Improved chemiluminescent Western blotting procedure. BioTechniques, 12(6): 748～753.

Heidebrecht F, Heidebrecht A, Schulz I. 2009. Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range. J Immunol Methods, 345(1-2): 40～48.

Kaur J, Bachhawat AK. 2009. A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. Anal Biochem, 384(2): 348～349.

Kurien BT, Scofield RH. 2009. A brief review of other notable protein blotting methods. Methods Mol Biol, 536: 367～384.

Manoussopoalos IN, Tsagris M. 2009. Native electrophoresis and western blot analysis: method and applications. Methods Mol Biol, 536: 277～287.

Penna A, Cahalan M. 2007. Western blotting using the invitrogen. nuPage Novex Bis Tris MiniGels, 7: 264.

Sackstein R, Fuhlbrigge R. 2009. Western blot analysis of adhesive interactions under fluid shear conditions: the blot rolling Massay. Methods Mol Biol, 536: 343～354.

Tesfaigzi J, Smith-Harrison W, Carlson D, et al. 1995. A simple method for reusing western blot on PVDF membrane. BioTechniques, 17(2): 268～269.

第二十三章　蛋白质相互作用

免疫细胞膜表面分布着各种各样的膜表面受体，这些受体特异性地与外界信息分子结合，并诱导产生一定生理应答的过程称为跨膜信息传递，整个过程包括受体识别、信号转导和细胞内效应3个环节。每个环节都由不同蛋白质复合体参与完成，所以研究蛋白质相互作用在免疫学研究中非常关键。但是蛋白质相互作用的结构基础尚未被研究清楚，因此即使蛋白质的结构已知并且预先知道它会发生相互作用，仍无法对其相互作用界面做出准确预测。这个问题与蛋白质“折叠问题”的难度不相上下，“折叠问题”的难度就在于根据蛋白质的氨基酸序列无法预测其三维结构。直到现在，蛋白质数据库中的蛋白质复合体大都是抗体-抗原或蛋白酶-抑制剂的复合体，这些都是经典的复合体。

蛋白质相互作用分为以下两类：①结构域-结构域相互作用：两个独立折叠的结构域形成一个界面，形成界面的蛋白质表面通常由一个以上的多肽片段组成，如膜受体和其配体的结合。②结构域-肽相互作用：一个蛋白质的折叠结构域与另一个蛋白质通过小部分未折叠的松散结构域相互作用，如组织相容性复合体（MHC）-抗原复合体。

分析蛋白质相互作用的方法有很多，但免疫学领域应用比较广泛的包括：酵母双杂交技术、免疫共沉淀技术、Far Western、GST pull-down技术和BIACore技术。本章将逐一介绍这些技术的原理、方法、应用和注意事项。

第一节　酵母双杂交系统的原理与应用

只有两株酵母菌接合（mating）后产生的杂交体才能报道蛋白质是否存在相互作用，因而取名酵母双杂交。酵母双杂交系统包括目标蛋白、cDNA文库、报道系统和相应酵母菌。目标蛋白是课题所研究的蛋白，cDNA文库用来筛选与目标蛋白相互作用的蛋白质，报道系统用来指示目标蛋白与cDNA文库包含的各种蛋白质是否存在相互作用，酵母菌用来转化目标蛋白和cDNA文库。酵母双杂交系统是研究目标蛋白潜在的或者新的相互作用蛋白质有力手段，近年不断改进酵母双杂交系统，其筛选通量和筛选应用面都得到扩大。

一、酵母双杂交系统分类

酵母双杂交技术差别在于根据报道系统，一般分为以下4类。

1. 经典酵母双杂交系统

经典的酵母双杂交系统主要是利用转录因子Gal4p：其天然结构含有一个DNA结合域和一个转录激活域，Gal4p氨基端的147（$Gal4_{1\text{-}147}$）编码DNA结合域（binding

domain，BD)，而羧基端 114 个残基（$Gal4_{768-881}$）含有一个很强的转录激活结构域（activating domain，AD)。如果两个蛋白质间有直接的相互作用，分别连接在这两个蛋白质上的 BD 和 AD 结构域就能够组成完整的转录因子，从而启动含有 Gal4p 可识别的 cis 元件［上游激活序列（upstream activating sequence，UAS)］的启动子的转录。因此，独立的 BD 和 AD 可分别融合到两个蛋白质中，假若这两个蛋白质能发生相互作用，具有 GAL4-UAS 元件的基因就会通过转录来报道这种相互作用。同理，其他的 BD（合适的 cis 元件）和（或）AD 也可以用于这项研究技术。

2. 双诱饵酵母双杂交系统

这一方法衍生自经典的双杂交系统，它能够同时评价两个不同的诱饵与一个作用对象的相互作用。在这个系统里，一个目标蛋白被融合到 DNA 结合蛋白 LexA 并表达，充当诱饵 1，而第 2 个目标蛋白个则被融合到 DNA 结合蛋白 cI（诱饵 2）上并表达。被设计用来作为这 2 个诱饵筛选的酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）载有 4 个独立的报道基因：*LacZ* 和 *LEU2* 都被一个针对 LexA 的操纵子来控制转录（*lexAop-LacZ* 以及 *lexAop-LEU2*），而 *GusA* 及 *LYS2* 都由 cI 的操纵子来调控转录（*cIop-GusA* 以及 *cIop-LYS2*），该杂交系统激活结构域（activation-domain，AD）的融合蛋白可以是一个蛋白质，或者 cDNA 文库。通过观察报道基因的转录激活，来确定 2 个目标蛋白的相互作用蛋白以及相互作用蛋白的特异性。例如，假若 AD 融合蛋白（蛋白 X）更优先与诱饵 1 相互作用，那么 *LacZ-LEU2* 的活性就大于 *LYS2-GusA*，说明该蛋白 X 与第 1 个目标蛋白结合力强，反之亦然。同样目标蛋白 2 可以是一个相对惰性的蛋白质（即公认的相互作用蛋白很少或相对已知，如核纤层蛋白)，用来做内参，假如蛋白 X 与目标蛋白 1 所代表的突变体结合力强，则报道系统 *LacZ-LEU2* 活性强，而 *GusA-LEU2* 报道系统没有激活，则说明蛋白 X 与目标蛋白 1 的相互作用是特异的，用以评价蛋白 X 与目标蛋白结合的特异性。

3. 分裂-泛素酵母双杂交系统

分裂-泛素系统（split-ubiquitin system）是一种以泛素的氨基端和羧基端替代 AD 和 BD 的系统。泛素是由 76 个氨基酸残基组成的小分子蛋白质，泛素的羧基末端能通过一个酰胺基同各种蛋白质连接，这种连接能被泛素特异性蛋白酶（ubiquitin-specific protease，UBP）识别并剪切泛素与蛋白质之间的共价链。与双杂交系统相似，将泛素分成两个部分（类似于经典酵母双杂交系统的 Gal4p 转录因子被拆成两个部分)，用两个独立的质粒来分别表达，一个是泛素的氨基端 1～37 位氨基酸组成的 ubN，另一个是羧基端 35～76 位氨基酸组成的 ubC。该系统的报道系统是一个完整转录因子（TF)。目标蛋白和报道转录因子分别被设计与 ubC 的氨基端和羧基端相连，而 cDNA 文库中包含的蛋白则与 ubN 相连，当 ubC 与 ubN 共表达时，假如存在蛋白质相互作用，则这两个分裂的泛素片段将重新组装成完整的泛素，从而被 UBP 识别并剪切泛素和报道转录因子的链接，并引起报道转录因子的释放。在分裂泛素系统，Nub 片段的氨基端被做了位点突变修饰（ubNG)，从而使它不能自发同 ubC 相连。只有当两个融合蛋白经相互作用发生相连时，ubNG 和 ubC 报道蛋白才会发生组装成完整的泛素。

4. 反向酵母双杂交系统

通过经典的双杂交方法确认两种蛋白质存在相互作用后，就可以让其中一个蛋白质发生突变，以观察目标蛋白不同突变体与蛋白 X 的相互作用强弱，产生并且应用这种突变体的方法就是反向酵母双杂交方法，以研究目标蛋白质结合蛋白 X 的特定位点或特定功能域。当目标蛋白质与多个蛋白质都发生相互作用时，这种方法显得尤为有效，因为反向酵母双杂交系统可以确定哪些突变体与某个原先相互作用的蛋白质不再发生相互作用，但与其他的蛋白质仍然保持相互作用，即出现特异性相互作用缺失性突变。此方法的主要特征是基于 PCR 对任一编码区内的特定区域做随机突变，通过蛋白质印迹技术检测融合蛋白上的标签来以便确认每个突变体的表达水平，然后检测相互作用蛋白的结合情况。当目标蛋白与一个蛋白质的相互作用丧失而与其他相关蛋白质仍保持相互作用，则说明该突变体的特异性相互作用蛋白质，这一特点研究该蛋白质相互作用特异性提供有力的线索。

二、酵母双杂交系统的应用

经典酵母双杂交系统能够比较全面的发现与目标蛋白相互作用的未知蛋白质。操作相对简单，适合发现相互作用尚不明确或研究较少的蛋白质的研究。双诱饵系统能够同时检测并区分出一种以上的蛋白质间相互作用，这两个诱饵蛋白可以被同时用来筛选有相互作用的搭档，其中一个作为目标诱饵，另外一个作为非特异对照；也可以被用于对相同诱饵的野生型、位点突变及结构域缺失突变型进行检测，但过程复杂。分裂-泛素酵母双杂交系统能够克服经典酵母双杂交系统缺陷。例如，不能入核的膜蛋白以及胞质蛋白、依赖于在内质网发生翻译后修饰如糖基化、二硫键形成后才发挥生理功能的蛋白质；有些蛋白质本身就是转录激活因子，它即使不与其搭档相互作用也可激活转录，这些不能采用经典酵母双杂交的蛋白适合用分裂-泛素系统来进行研究。反向酵母双杂交系统适合对已经得到经典双杂交系统的结果，进一步细化研究。所有酵母双杂交系统得到的结果都需要进一步用免疫共沉淀、GST pull-down 等技术进一步验证。

第二节　酵母双杂交系统应用实例

本节以证实 TAK1（transforming growth factor β activated kinase 1）与 Tab1（TAK1-binding protein）相互作用，和发现新的与 TAK1 相互作用蛋白质为例子举例说明。①构建双杂交质粒：将 TAK1 和 Tab1 分别通过酵母同源性重组原理插入 pOBD 和 pOAD 质粒，通过酵母接合产生包含 pOBD 和 pOAD 质粒杂交体酵母菌；②分析相互作用：分析杂交体酵母菌报道基因表达，以指示是否存在蛋白质相互作用；③从文库中筛选新的相互作用蛋白质（用于发现 TAK1 的新的相互作用蛋白）：将 cDNA 文库克隆入 pOAD 质粒或者直接购买构建好的商业化 cDNA 文库；④接合酵母菌，并分析报道基因表达；⑤再次验证这个新的相互作用分子。

材料与试剂

除非特殊说明，以下所有化学试剂均购自 Sigma

菌株：PJ694A 酵母株（用于转化 pOAD 质粒），PJ694a 酵母株（用于转化 pOBD 质粒）

载体：pOBD：带有 TRP1 标记的 GAL4 DNA 结合结构域融合载体。pOAD：带有 LEU2 标记的 GAL4 转录激活结构域融合载体

目标基因 cDNA

cDNA 文库：包含转录活化结构域文库，－20℃保存

正常培养基（YEPD 培养基）：1%的酵母提取物；2%的蛋白胨（Difico）；1.4%的 Meer 琼脂（Difico），消毒后，加入 2%的葡萄糖（Fisher），4℃保存

缺陷型培养基：0.67%的无氨基酸酵母氮源（Difico）。1.4%的 Meer 琼脂，消毒后，加入 1%的氨基酸混合物和 2%的葡萄糖。缺陷型培养基是在上述的基础上不含有某些成分，如 Trp^- 表示不含色氨酸，Leu^- 表示不含亮氨酸，Trp^-、Leu^- 表示不含色氨酸和亮氨酸。Trp^-、Leu^-、Ade^- 表示不含色氨酸、亮氨酸和腺嘌呤。而 Trp^-、Ieu^-、His^-、Xmmol/L $3AT^+$ 表示无色氨酸、亮氨酸及组氨酸，但添加了 3AT（组氨酸拮抗物）。所有这些培养基均应 4℃保存

3AT 贮存液：用双蒸水配制 1mmol/L 的 3 氨基-1，2，4 三唑，－20℃保存

酵母 β-半乳糖苷酶分析试剂盒（Pierce），－20℃保存

大肠杆菌 DH5α 和 MH_4（$LeuB^-$）

M9 基本培养基（1L）：750ml 双蒸水，5×M9 盐，15g Meer 琼脂，定容至 980ml；再加入 2ml 的 1mol/L $MgSO_4$。0.1ml 1mol/L $CaCl_2$，消毒后，加入 20ml 20%的葡萄糖，4℃保存

5×M9 盐（1L）：64g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$，15g KH_2PO_4，2.5g NaCl 及 5g NH_4Cl

LB 培养皿（1L）：14g Meer 琼脂，10g 色氨酸，5g 酵母提取物，5g NaCl，1ml 1mmol/L 的 NaOH。高压灭菌冷却至 45℃左右后，加入氨苄青霉素（终浓度为 10μg/ml）。4℃保存

PCR 酶，限制性内切核酸酶，以及 T4 DNA 连接酶

酵母 10×氨基酸混合物，每升含有：0.2g 腺嘌呤，0.2g 精氨酸，0.2g 组氨酸，0.3g 异亮氨酸，1.0g 亮氨酸，0.3g 赖氨酸，0.2g 甲硫氨酸 0.5g 苯丙氨酸，2.0g 苏氨酸，0.2g 色氨酸，0.3g 酪氨酸，0.2g 尿嘧啶，1.5g 缬氨酸。对于缺陷成分培养基则需要去除相应的成分

LiOAc-PGE 溶液：40% PEG（Fisher），100mmol/L 乙酸锂（lithium acetate，LiOAc），10mmol/L Tris-HCl，1mmol/LEDTA（TE）。使用时用 50% PEG 4000，1mmol/L Tri-HCl，pH7.5，200mmol/L EDTA（TE）新鲜配制。剧烈涡振荡达到完全混匀

处理过的鲑鱼精 DNA（Sigma）（5mg/ml）

小量质粒纯化试剂盒和大量质粒纯试剂盒

凝胶样品回收试剂盒

400～500μm 酸洗过的玻璃小珠（Sigma）

副本印模（replica stamp）及丝绒（velvet），用锡箔纸包使用前高压消毒

步骤

1. 双杂交质粒的构建

采用 PCR 扩增出目标序列

根据所选用的酵母双杂交系统 pOAD 和 pOBD 载体需要，扩增出 TAK1 和 Tab1 序列并纯化。

通过同源性重组将目标基因克隆到载体

利用酵母内同源重组的原理，将目标蛋白 cDNA 插入 pOAD（Tab1）和 pOBD（TAK1）载体［见注意事项 1］。

1）PJ694A（用于 pOAD）或 PJ694a（用于 pOBD）酵母株的单个克隆接种于 5ml YEPD 液体里，并在 30℃振荡过夜生长。

2）将 1.0ml 饱和酵母培养物转移到 1.5ml 离心管，可供 1 次转染用。

3）1000*g* 离心 1min 沉淀酵母菌（以下离心酵母菌均采用该离心力）后吸弃上清。使用的鲑鱼精需要先煮沸 5min，然后立即置于冰上。向每管加入 3μl 的鲑鱼精（5mg/ml）作为封闭用。

4）将 1.5ml 离心管进行旋涡振荡，向有 PJ694A 的每管内加入 1μl 经 *Nco* Ⅰ切割和胶回收纯化的 pOAD 质粒，而给每管 PJ694A 加入 *Nco* Ⅰ酶切并胶回收纯化过的 pOBD 质粒。

5）将 1.5ml 离心管进行旋涡混匀，向相应 1.5ml 离心管内加入 0.1～0.5μg 的 TAK1 和 Tab1 的 PCR 产物（酶切并纯化过的），接着再将 1.5ml 离心管进行旋涡混匀。

6）向每管内加入 500μl 新鲜制备的 LiOAc/PEG，并用枪反复吹打这种黏稠液体以充分混合。

7）再加 57μl DMSO，将 1.5ml 离心管进行旋涡混匀，于 30℃孵育 15min。

8）接着于 42℃水浴槽中孵育 15min 进行热休克。

9）离心收集酵母菌，吸弃上清。加入 500μl 1×TE 液重悬酵母菌，再离心 1min。

10）吸去 400μl 上清，留有大约 100μl 的酵母菌悬液，接种于缺陷培养皿［缺少相应的氨基酸，对 pOAD 培养基缺亮氨酸（Leu^-），而对于 pOBD 培养基缺色氨酸（Trp^-）］。接着再将培养皿倒置，30℃孵育 3d。

验证插入到载体的基因

通过对那些加有 PCR 产物和单独转染载体的培养皿上的克隆数量进行比较，估计带有插入片段克隆的数量。

1）取 TAK1 融合 BD、Tab1 融合 AD 的 5 个克隆接种于 5ml 相应的缺陷培养基，用于质粒抽提。

2）采用电穿孔法或热休克法将质粒转染进大肠杆菌（DH5α），摇菌培养过夜，再用小量质粒抽提试剂盒提取质粒，于测序鉴定。

3）选取测序正确的 pOAD 和 pOBD 载体用于双杂交分析［见注意事项 2］。

2. 分析

通过酵母菌接合来表达杂交体

将表达 AD 融合的每种单倍体（PJ694A）克隆用少量水重悬，接着各取 2μl 悬液点样于一个 YEPD 培养皿上。待液体干后再在这些接种点上相应的加上 BD 融合酵母菌悬液（PJ694a），于 30℃孵育 24h。

接着，采用消毒过的 Velvet 将 YEPD 培养皿影印到双倍体择性培养皿（即 SD/Trp$^-$ Leu$^-$）上进行继续培养筛选。该培养皿能选出杂交体是因为只有同时带有耐 LEU2 的 pOAD 和载有 TRP-1 的 pOBD 的酵母菌才能生长；而带有这些质粒的酵母菌是已经发生过接合的酵母菌（PJ694A/a 杂交体）。这些生长杂交体的培养皿需要继续于 30℃生长 3d。

影印培养皿到选择性培养基继续培养

影印培养皿（replica plating）到选择性培养基形成杂交体菌落，并用消毒过的 Velvet 检测报道基因是否激活。选择性培养基包括（SD/Trp$^-$ Leu$^-$）Ade$^-$，His$^-$ 以及带有 3AT（His 的化学抑制剂）的 His$^-$［且分别采用 4 种不同的剂量：3mmol/L、30mmol/L、50mmol/L 及 100mmol/L，见注意事项 3)］。于 30℃培养 3d。

β-半乳糖苷酶分析评价报道基因转录的强度

酵母 β-半乳糖苷酶分析盒可用于对每个杂交体克隆的 β-半乳糖苷酶活性进行分析，根据试剂盒提供的手册进行操作。然后根据 β-半乳糖苷酶活性判断 TAK1 和 Tab1 相互作用。

以上步骤是研究 TAK1 与 Tab1 相互作用的方法，如果想研究 TAK1 其他的新的相互作用蛋白质，那就需要构建 cDNA 文库，到文库中筛选新的相互作用蛋白质。以下开始阐述文库构建过程。

3. 筛选转录激活文库

研究一个新发现的蛋白质或者研究已知蛋白质（这里称为目标蛋白质）的新相互作用蛋白质时，酵母双杂交系统就是初步筛选的最好方法之一。可以从融合 Gal4p-AD 的 cDNA 文库中筛选出相互作用蛋白质。在进行文库筛选实验之前，有一个重要步骤就是确认 Gal4p-BD 融合蛋白本身不能够激活报道基因。

首先将带有融合 BD 的目标蛋白的 pOBD 和 pOAD 共同转化酵母菌。然后挑取这些转化体接种于 SD/Trp$^-$ Leu$^-$ His$^-$ 3mmol/L 3AT$^+$ 培养皿，观察其生长情况。也可以将 BD 融合/pOAD 与 pOBD/pOAD 酵母菌进行 β-半乳糖苷酶活力测定比较。

假若所构建 Gal4p-BD 融合蛋白在酵母表达且不会自发激活，那么就可以利用它对 AD 文库去筛选有相互作用的蛋白质。假若所构建的 BD 融合单独就能激活报道基因，那就需要采用更高浓度的 3AT 来抑制自发转录活性，或者也可使用目标蛋白的突变体进行 BD 融合体构建［见注意事项 4)］。

文库构建

合适的转录激活结构域文库要求 cDNA 文库的足够的蛋白质的数量和质量。可以

自行构建或直接购买商业化转录激活结构域文库，如 BD、Biosciences、Clontech 公司等都提供文库。下文将集中介绍含融合 Gal4p-BD 蛋白在融合 AD 蛋白的文库中筛选相互作用蛋白质过程。

筛选的方案

根据得到的文库的形式和数量，按需要进行文库扩增。但建议尽可能不要扩增文库，因为在大肠杆菌中扩增过程中会导致一些稀有克隆的丢失。当然，如果需要多次使用这个文库进行筛选，扩增就是必要的。推荐使用 50μg 的文库 DNA 去转化 1L 的大肠杆菌，量也可适当调整。具体实验方案需要根据这个文库的复杂性，即这个文库中有多少不同的插入片段来决定。

如果需要得到多倍转化体（至少大于 3 倍），以减少操作不慎造成单个 AD-cDNA 与目标蛋白-BD 配对的假阴性结果，例如，使用的 AD 文库有 1×10^5 个不同的插入片段，而想得到 10^6 个转化体（使用 50μg DNA 转化 1L 的细菌足以保证扩增效率），即扩增 10 倍于文库的克隆量，或者说每个插入片段都已经转化到 10 个不同细菌克隆里。

1）文库的扩增。

(1) 先计算出用于电穿孔细菌每微克 DNA 的克隆形成单位的数量（cfu/μg），用文库 DNA（如 1～10μg）的一小部分进行大肠杆菌的电穿孔，分别稀释成 1∶10、1∶100 以及 1∶1000 后，再将其铺板在多个 150mm 含氨苄青霉素（抗性有 pOAD 载体抗体决定）的 LB 培养皿上生长，以确保有一个正确的 cfu/μg 数值。根据这个数值，确定需要多少个 150mm 的 LB 氨苄青霉素培养皿（大约 2000 个克隆/培养皿），以保证 cDNA 每个克隆都被扩增。

(2) 以上面所计算的文库 DNA 需要量以及转化细菌量，用电穿转化大肠杆菌，于 37℃生长过夜。

(3) 按照 1.0ml 细菌每个平皿的比例将细菌铺到多个平皿上，培养过夜形成单克隆，用涂菌器轻轻刮下每个克隆，也可用细胞培养用的细胞刮匙，但要小心别刮起太多的琼脂。

(4) DNA 抽提。

(5) 用荧光计或分光光度计对提取的 DNA 进行定量。

2）转化酵母。

(1) 先前已转化融合诱饵蛋白 BD 质粒的 PJ694a 酵母菌接种到 1.0L 的 YEPD 培养基，直到对数生长期（1×10^7 个/ml 或在 660nm 波长的吸光度为 0.5～0.6）。

(2) 1000g 离心 15min，沉淀酵母菌，弃上清。

(3) 500ml 的双蒸水重悬菌，再次离心，弃上清。

(4) 再用 8ml TE/LiOAc 重悬菌，将其转移到一个 200ml 带螺帽的离心瓶里，旋涡混匀。

(5) 加入 20mg 已剪切过的鲑鱼精 DNA（煮沸 5min 并立即至于冰上），旋涡混匀。

(6) 在酵母菌中加入 50～500μg AD 文库 DNA，旋涡混匀。

(7) 再加入 60ml 的 PEG/LiOAc，旋涡混匀。

(8) 加入 DMSO 至终浓度为 10%，反复颠倒混匀。

(9) 于 42℃水浴槽热休克处理 15min，期间可间断摇晃几下以保持酵母菌受热均匀。

(10) 再立即置于冰上冷却，期间可间断摇晃几下以保持酵母菌温度一致。

(11) 常温下 1000*g* 离心 5min。

(12) 用 10ml TE 重悬这些已转化的酵母菌。

(13) 随后将按 1∶10、1∶100、1∶1000 的比例稀释的酵母菌悬液各取出 100μl 铺板于 SD/Trp^- Leu^- 培养皿上来确定转化效率。

(14) 将剩余的菌悬液铺于 40 个（250μl/个）150mm 的 SD/Trp^- His^- 3mmol/L $3AT^+$ 培养皿上（3AT 的浓度可根据 BD 融合量来参考决定）。

(15) 倒扣培养皿，于 30℃孵育 2 周［见注意事项 5］。3d 后检查阳性克隆。

鉴定阳性克隆

挑取培养基上的阳性克隆，将它接种于一个新的 SD/Trp^- Leu^- His^- $3AT^+$ 培养皿上，接着对复制到 SD/Trp^- Leu^- Ade^- 培养皿的克隆测定 β-半乳糖苷酶活性来确定报道基因的激活。

在 Ade^- 培养皿里可能长出几种不同的克隆：①生长旺盛的白色集落；②粉红色，中度生长的集落；③红色，少量或不生长的集落。可首选白色集落，因为它代表最强的阳性克隆。由于 *ADE2* 报道基因很有说服力，因此假若挑选不到理想的阳性克隆或者是在 Ade^- 培养皿上没有白色集落，也可用 *HIS3* 和 *lacZ* 报道基因筛选阳性克隆。

4. 再次检验阳性克隆

经过上述的初步筛选，可以得到许多候选克隆做进一步研究。这时需要再次对它进行检验。通过提取质粒并转化到原始酵母菌，可以首先确定报道基因的激活是否是由于双杂交质粒的作用。对照空 pOBD 载体以及其他 BD 融合体进行 AD 融合体的检测很重要。这样可以确认阳性克隆是否是因为 BD 融合质粒非特异性地激活了报道基因。最后，还需要采用互相融合（reciprocal fusion）或其他实验方法来再次复现这种通过双杂交观察到的相互作用。

提取质粒进行再次检测

1) 将筛选到能激活所有报道基因的阳性克隆接种于 5ml SD/Trp^- Leu^- 液态培养基里，30℃振荡生长过夜。

2) 常温下 1000*g* 离心 5min 收集酵母菌。

3) 用 1ml 水重悬酵母菌，并转移至 1.5ml 离心管中，快速离心后弃上清，收集酵母菌。

4) 采用小提质粒法提取质粒，其中除加入 250μl 的 P1 缓冲液外，还加入大约 100μl 的 400～500μm 经酸洗过的玻璃珠，旋涡混匀 7min，再按标准方法继续实验。

5）用 1～5μl 提取到的质粒对 MH_4（*leuB*⁻）大肠杆菌进行电穿孔转化。

6）将一半的细菌接种到带氨苄青霉素的 LB 培养基上，另外一半接种到 M9 基本培养基上［见注意事项 6)］。

7）假若使用的是含氨苄青霉素的 LB 培养基生长的克隆，复制培养皿（replica-plate）或从 M9 培养基可选取含 *LEU2*（AD 融合）质粒的细菌。

8）小提质粒 DNA。通过对位于 AD 载体上的启动子进行测序可证实插入片段，使用的是 5′-TACCACTACAATGGATGATGTATATAAC-3′引物来测序插入基因的 5′端，而用 5′-GATGCACAGTTGAAGTGAACTTGCGG-3′来测序插入基因的 3′端。

9）AD 融合的可读框内插入片段与 BD 融合蛋白有相互作用，需要通过转化实验和双杂交实验再次检测证实［见注意事项 1)］。

检验转录激活结构域融合

采用单个诱饵质粒获得的阳性发现还应注意的是，阳性的 AD 融合很可能是假阳性，就是当有一些（或大量）待测 BD 融合存在时，AD 融合蛋白质激活了报道基因。采用测试多个 BD 融合的方法可鉴别假阳性克隆。

1）用 AD 融合 DNA 反向转化 PJ694A。

2）用 pOBD 以及至少一个 BD 融合转化 PJ694a。注意：使用的 BD 融合 DNA 最好是无关对照，如 BD-核纤层蛋白就是一个比较好的检测 DNA。

3）进行接合实验去进行双杂交分析，来检测报道基因的活化。

4）与不相关 BD 融合 DNA 相互作用的 AD 融合 DNA 可以弃之，它可能是假阳性。

5）进一步研究那些与的 BD 融合 DNA 有特异性相互作用的 AD 融合 DNA。

独立证实相互作用

将筛选出的有相互作用的蛋白质，进行下游实验（如免疫共沉淀、GST pull-down 等）证实相互作用。

注意事项

1）不同公司提供的酵母双杂交系统所提供载体的克隆位点、抗性等稍有区别。该实验方案使用 ResGen（Invitrogen）酵母可读框集，其中每个酵母的可读框在其 5′端都有 20 个相同的核苷酸，而在 3′端有 20 个不同的核苷酸序列。这样使得一对引物就可以扩增任何可读框。这个策略可显著加快构建各种 pOBD 和 pOAD 载体融合体。然而，假若只需要构建几个融合体，可使用 ResGen 20mer 编码的位点来进行限制性内切核酸酶的切割和连接，ResGen 20mer 包括了载体的头部和尾部（酶切位点参见该公司网页提供的说明书）。

2）针对 Gal4p AD 和 BD 的商业化抗体，对检测的 pOAD 和 pOBD 载体表达并不好用，可能由于 AD 和 BD 载体在酵母菌表达量较低。假若有针对所感兴趣的蛋白质的抗体，也可以用 Western 印迹来确认可读框内插入片段。

3）PJ694A/a 能单独在 His⁻上生长，是由于这些品系里低剂量自发表达 *HIS3* 报道基因。针对这个问题，可向培养基中加入 3-氨基-1,2,4-三唑（3-amino-1,2,

4-triazole,3AT)，因为3AT是*HIS3*基因产物的一个化学抑制剂。因此，培养基中的3AT越多，则生长所需的*HIS3*基因转录也就越多。因此双杂交信号的强度能够根据含有双杂交配对的酵母菌所能抵抗的3AT的浓度估测得到。

4）如果诱饵蛋白自动激活报道基因，可以试着将带有BD融合的酵母菌在更高浓度的3AT培养基中培养，直到找到它不再能拮抗的那个3AT浓度点。然后在该浓度进行文库筛选。另外一种方法是，删去目标蛋白部分/结构域，以去除那段参与激活转录的氨基酸，并在筛选文库之前测试报道基因是否仍存在激活作用。

5）当在30℃孵育培养皿较长时间时，一定要在孵箱内放置盛有清洁的水的盘子以保证湿度。也可以将培养皿放在Petri培养皿自带的塑料套里，从而防止培养皿内的水分丢失过多。

6）只有当MH_4株用带有*LEU2*的质粒（AD融合质粒）才能在基本培养基上生长，因此可以通过对这些大肠杆菌进行传代分离出BD和AD质粒。然而，由于生长较慢，一般需要2d的时间才能长出集落，因此，也将其接种在含氨苄青霉素的LB培养基上，并在1d后将其影印到M9基本培养基上以得到足够大的集落。

第三节　免疫共沉淀原理与应用

用来检测两个蛋白质是否能够相互作用最简单的方法是免疫共沉淀（immunoprecipitation，IP）。本节提供的实验方案是：抗体负责结合靶蛋白，偶联琼脂的蛋白A/G结合抗体的Fc段，形成琼脂-蛋白A/G-抗体-靶蛋白（及其靶蛋白相互作用分子）的复合物，洗脱掉非特异的蛋白质以后，再通过Western印迹来检测复合物中的靶蛋白。由于蛋白质-蛋白质相互作用的多样性，所以每个具体的免疫共沉淀实验都需要根据目标蛋白特性（翻译后修饰、细胞内定位等）做出相应调整。而本章节的目标在于提供关于免疫共沉淀分析的基本实验条件，并介绍一些关于进一步优化实验条件的方法。

一、免疫共沉淀分类

（一）内源性表达蛋白质的免疫共沉淀

例如，用抗TAK1抗体直接共沉淀与TAK1相互作用的分子，并可以观察不同时间点TAK1结合蛋白的动态变化。其优点为：相互作用的蛋白质都是经翻译后修饰的，处于天然状态；蛋白质的相互作用是在生理状态下进行的，可以避免人为表达蛋白质的影响；可以分离得到天然状态的相互作用蛋白质复合物。其缺点为：可能检测不到低亲和力和瞬间的蛋白质-蛋白质相互作用；两种蛋白质的结合可能不是直接结合，而可能有第三者在中间起桥梁作用；必须在实验前预测目标蛋白是什么，或者根据酵母双杂交证实的相互作用分子，以选择最后检测的抗体。在免疫共沉淀实验中要保证实验结果的

真实性，应注意以下几点：①确保共沉淀的蛋白质是由所加入的抗体沉淀得到的，而不是非特异蛋白，单克隆抗体或者高亲和力的多抗的使用有助于避免非特异的发生；②确保抗体的特异性，即在不表达抗原的细胞裂解物中添加抗体后不会引起共沉淀；③确定蛋白质间的相互作用是发生在细胞中，而不是由于细胞的裂解才发生的，这需要进行蛋白质的定位来确定。

（二）外源性表达蛋白免疫共沉淀

在HEK293（最常用）细胞中过表达研究的目标蛋白，如TAK1-myc-Tag和Tab1-HA-Tag在HEK293细胞中过表达，然后用相应抗体（如抗myc-Tag、HA-Tag等）分别共沉淀TAK1和Tab1，用Western印迹分别检测TAK1-myc-Tag上结合的Tab-HA-Tag蛋白，或Tab-HA-Tag上结合的TAK1-myc-Tag蛋白。这类方法的优点是可以观察目标蛋白特点位点突变或不同片段与靶分子的结合，从而确定相互作用的蛋白质序列。缺点是观察的蛋白质之间的相互作用不是内源性的，所以不能做动态观察。

二、免疫共沉淀应用

在免疫学实验过程中，往往同时使用外源性和内源性表达蛋白免疫共沉淀，以说明该蛋白质复合体存在的真实性。

三、免疫共沉淀技术局限性

内源性表达蛋白免疫共沉淀不能检测到比较弱的蛋白质相互作用，而外源性表达蛋白免疫共沉淀则不能代表体内相互作用过程。免疫共沉淀也很难证实这两种蛋白质是否是直接发生相互作用。还有，免疫沉淀研究并不能提供这种相互作用的亲和力或化学计量学方面的定量资料。蛋白质的变异以及许多影响蛋白质结构和相互作用的因素取决于实验条件（即细胞系、缓冲液成分等），都可影响实验的结果。

第四节　免疫共沉淀应用实例

以下以证实TAK1与Tab1相互作用，介绍外源性表达蛋白和内源性表达蛋白的免疫共沉淀过程。

材料与试剂

HEK293细胞系（ATCC）或需要观察目标细胞

RIPA细胞裂解液（CST公司）：150mmol/L NaCl，10mmol/L HEPES，pH7.5，0.2% Igepal CA-630或NP-40，5mmol/L氟化钠，5mmol/L焦磷酸钠，2mmol/L正钒酸钠，10mg/L抑肽酶，10mg/L亮肽素，1mmol/L苯甲基磺酰氟化物（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF），4℃冰箱保存［见注意事项1］

捕获抗体（抗myc、HA等抗体）

Protein A/G Sepharose 4（Santa Cruz，CA），即 PAGS［见注意事项 2)］

洗脱液：150mmol/L NaCl，10mmol/L HEPES，pH 7.5，0.1%Triton 或 NP-40，4℃保存

Western 印迹仪器和缓冲液（参见第二十一章和第二十二章）

步骤

1. 裂解细胞

在进行一项新的免疫沉淀实验时，表达的诱饵蛋白和靶蛋白都融合两个不同亲和标签（常用的包括 myc、his、HA、Flag 和 X-tag 等）。这些抗体结合抗原能力强，很少有非特异性。初次实验，设立阴性对照，以排除免疫共沉淀的非特异性也是必要的。如除双转染细胞外，还应取少量的未转染或单独染（诱饵或靶）细胞一起测试。假若事先能预测这两种蛋白质相互作用的结构域，也可用突变蛋白来进行验证。

转染

1）构建表达载体（TAK1-myc 和 Tab1-HA），或一系列带标签的突变体［见注意事项 4)］。

2）用构建好的诱饵蛋白和靶蛋白表达载体转染 4 个 6 孔板的孔的 HEK293 细胞。分别为：TAK1-myc＋Tab1-HA 2 个孔（分别作 myc 和 HA-IP），单独转染 TAK1-myc 和 Tab1-HA 各一个孔（作为对照用）。转染方法可采用常用的脂质体转染方法（如 Lipofectamin2000，Invitrogen）或其他公司转染试剂。

3）培养细胞 24～48h，让其充分表达蛋白质。收细胞时其融合度尽可能达到80%～100%。

收集细胞

1）弃去培养基，向每孔细胞内加入 1ml PBS 并轻柔摇数下，弃去 PBS。

2）再向每孔细胞内加入 200～500μl 细胞裂解液，冰水上孵育 10min，用细胞刮子刮下或移液器吹打数次，吸取细胞裂解液到 1.5ml 离心管。

3）4℃下 14 000g 离心 10min，去除没有被裂解的细胞、细胞核和碎片。然后上清转移至干净的 1.5ml 离心管内。蛋白质定量（CBA 方法，Invitrogen）。

4）尽快使用收集的细胞裂解产物，以保证蛋白质复合物完整。或保存于在－70℃冰箱。

评价蛋白质表达情况

1）使用标准方法，一般进行免疫共沉淀实验前，必须肯定表达载体能够表达正确的目标蛋白。

2）免疫共沉淀结束后，Western 印迹检测时候，也需要检测全细胞总蛋白中目标蛋白的表达，一方面肯定目标蛋白表达量，另一方面肯定免疫共沉淀下来的蛋白质与是否为与细胞裂解液中表达的目标蛋白分子质量一致。

2. 免疫共沉淀

以下主要描述从细胞裂解产物里如何分离、纯化诱饵-靶蛋白复合体。第一步是预清除其目标是清除非特异蛋白。

对细胞裂解物的预清除［见注意事项 4)］

1）使用前，PAGS 应用裂解缓冲液进行洗脱清除 PAGS 液体中的甘油。每个样品需 10～20μl 50％的 PAGS 贮存悬液［见注意事项 4)］。使用微量离心机低速离心 30s，使 PAGS 沉淀，吸弃上清。加入等体积的细胞裂解缓冲液，通过轻弹管底重悬小珠使其充分混悬，使其成为含有 50％PAGS 的细胞裂解液悬液。

2）1.5ml 的离心管分别加入 200～500μg 细胞总蛋白和 10μl 的 50％PAGS，用细胞裂解液调整总体积为 500～1000μl。

3）于 4℃轻柔旋转混匀 PAGS/细胞裂解产物 30～60min。转动的力量压足以保持 PAGS 处于悬浮状态，但应同时避免气泡产生。

4）经 4℃下 6000～8000g 离心 1min 使 PAGS 沉淀。转移上清（即为已预清除过的裂解产物）到一个干净 1.5ml 离心管内。弃去 PAGS。

诱饵蛋白-抗体复合体的形成

1）在免疫共沉淀的过程中，通常根据文献或厂家提供的实验指南来选择捕获抗体。

2）对预清除过的细胞裂解物里加入 1～5μg 捕获抗体/500mg 全细胞蛋白［见注意事项 4)］。

3）于 4℃轻柔旋转摇匀，2～12h（根据抗原抗体结合力强弱决定），使捕获抗体与诱饵蛋白充分结合形成复合物。

沉淀抗体

1）向裂解物/抗体混合液里加入 10～20μl 的 50％PAGS。

2）轻柔旋转摇匀（4℃，30～120min），注意要能保持小珠处于悬浮状态并避免气泡产生。

洗脱

1）通过 4℃下 6000～8000g 离心 30～60s 使结合有抗体以及相关蛋白复合物的 PAGS 沉淀。小心去除上清，因为 PAGS 小块很容易被打散，故可保留少量（10～20μl）的上清以保持复合体湿润，避免变性。

2）于 4℃加入 500～1000μl 洗脱液，轻弹管底或来回颠倒使 PAGS 小珠重悬，离心弃上清。重复 2～5 次，共 3～6 次清洗。操作要快，整个过程均应在 4℃环境中进行。

3）加入 500μl 的 50mmol/L HEPES，pH7.5，到 PAGS 小珠里，使其再次重悬，离心弃去上清。低离子强度的 HEPES 缓冲液有助于防止产生 SDS-PAGE 过程中的凝胶假象。

4）加入 10～20μl 2×SDS 上样缓冲液。100℃水浴 2～5min 后，－20℃保存。

3. 分析沉淀下来的蛋白质复合体

在这一部分里，诱饵复合物在 SDS 里煮沸并变性，短暂离心使 PAGS 沉淀，而免疫共沉淀下来的蛋白质在上清中。再对这些蛋白质经 SDS-PAGE，Western 印迹来检测有无靶蛋白。有时在进行本实验前，也可将样品存于－20℃冰箱。但在融化后，在进行 SDS-PAGE 前应该再次于 100℃加热。内源性表达的蛋白质的免疫共沉淀目标是观察细胞中天然存在的蛋白质之间的相互作用，故不需要转染过程，其他步骤与外源性表达的

蛋白质的免疫共沉淀一样。

1）经 SDS-PAGE 分离样品，并将蛋白质转移到膜上。

2）对膜上所想要的靶蛋白进行检测，尽可能保证用于 Western 印迹的一抗与捕获抗体的属源不同［见注意事项 4)］。

4. 资料的解释和分选

理想情况下，如果外源性表达水平合适，并使用了直接针对诱饵蛋白标签的捕获抗体，这时将看到在转染的细胞样品里都有相同水平的诱饵蛋白表达，而在其他样品里却没有。免疫共沉淀转染诱饵蛋白和靶蛋白的实验组中存在蛋白质相互作用，而其他组则没有。这样的结果可以说明在转染细胞内，靶蛋白与诱饵蛋白能发生相互作用，但这并不意味着这些蛋白质是直接结合的。因为还可能同时有其他一些蛋白质来介导这种诱饵-靶蛋白相互作用。本章第三节 GST pull-down 实验以及第二十九章中 FRET 技术可用来证实这个问题。

假如免疫共沉淀对照组也能检测到出诱饵-靶蛋白复合物（即可能是非特异性结合），在得出诱饵-靶蛋白相互作用的结论前必须先降低背景。这也可通过加强洗脱来解决，在某些或所有洗脱的过程中，最常用的办法是适当增加清洗缓冲液内盐的浓度以去掉离子性的相互作用或用去污剂以去除疏水性相互作用。例如，氯化钠的浓度可提高到 500～900mmol/L，或更多，或一起使用不同浓度的多种去污剂，如 RIPA 缓冲液，它包含了 150mmol/L NaCl，10mmol/L HEPES，pH7.5 1%Triton X-100，0.1%SDS，1%的脱水胆酸钠。还有，在每次清洗过程中，PAGS 也可将其孵于洗脱液轻摇 5～15min。增加洗脱次数也有帮助。

如果诱饵-靶蛋白沉淀中看不到靶蛋白，提示在这个系统中，这两种蛋白质并不会发生相互作用。然而在得出诱饵与靶蛋白不能结合的结论前应考虑几个技术问题。这些问题及其相应的解决方法有：①捕获抗体会阻碍靶/诱饵相互作用吗？可试用另外一种捕获抗体；或在另外一个位置上加上标签，也可以试行反向免疫沉淀实验。②为了诱导出这种相互作用，其中一个蛋白质需要经过翻译后修饰吗？这可采用工具药来激动相应的激酶，抑制磷酸酶等；也可在裂解缓冲液内加入更广谱的抑制剂；最后，必要时可用另外一种细胞系进行实验。③Western 印迹有足够的敏感度检测到那些低丰度表达的免疫共沉淀靶蛋白吗？这时可换用不同的抗体进行 Western 印迹，或使用比 Western 印迹更为敏感的检测方法；或增加细胞裂解产物、抗体、PAGS 的量。④有内源性蛋白会与诱饵蛋白抗原表位出现相同的相互作用竞争吗？这可通过增加诱饵-靶蛋白的表达量，或换不同的细胞系，或采用相互免疫沉淀技术。

注意事项

1）用于免疫共沉淀实验的样品一般是原代培养细胞总蛋白或者细胞系总蛋白。以常用的 RIPA 裂解液为例（主要含有 pH7.4 左右的离子缓冲液，接近生理浓度下的 NaCl，一定比例的去垢剂和甘油以及各类蛋白酶抑制剂等）来说明其各主要成分的用途，进而帮助如何针对不同的实验目标和不同的蛋白质特性来选择最佳的裂解液。

(1) 离子缓冲液常采用 pH7.4 的 HEPES 或者 Tris-HCl。

(2) NaCl 浓度一般习惯用 150mmol/L，这主要是因为 150mmol/L 接近生理浓度，不会破坏蛋白质之间的相互作用。然而细胞内部的 NaCl 浓度并不是均一的，局部 NaCl 的浓度可以低到 50mmol/L，150mmol/L 的 NaCl 有可能会破坏这个区域的蛋白质相互作用。因此裂解液配方最佳的 NaCl 浓度要视所分析的蛋白质的亚细胞定位而定。

(3) 甘油由于其黏性，可以对蛋白质之间的相互作用起到一个很好的保护作用。一般添加 5%～10%的甘油有助于稳定蛋白质之间的相互作用。

(4) 裂解液中的去垢剂可以裂解细胞质膜，也同时破坏了许多细胞器的膜，从而释放了其中储存的许多蛋白酶。而由于用于免疫沉淀实验的去垢剂作用比较温和，因此蛋白酶的活性大部分得以保存。还有一部分蛋白酶来自胞质中，主要由于其抑制蛋白质或者其活性抑制环境受到改变后从而恢复了蛋白酶活性。因此，添加蛋白酶抑制剂对于防止目标蛋白的降解从而完成免疫沉淀实验非常关键。一般主要通过添加 EDTA 抑制金属蛋白酶，通过 Protease Cocktail（多种蛋白酶抑制剂混合物）可以抑制蛋白酶。

(5) 去垢剂对于免疫沉淀实验尤其是免疫共沉淀实验是一个非常关键的因素。不同的去垢剂种类和不同的去垢剂浓度主要通过影响以下 3 个因素来影响免疫沉淀效果：①细胞质/器膜的通透性：因为许多目标蛋白都定位在细胞器中，所以必须先将这些蛋白质释放出来，抗体才能与之反应。②膜蛋白的释放：许多膜蛋白的构象对去垢剂种类和浓度非常敏感，因此针对这类蛋白质的免疫沉淀实验，需要谨慎地尝试多种去垢剂以及不同浓度。③蛋白质相互作用：不同去垢剂对不同性质的蛋白质的相互作用影响程度不一样，需要根据具体蛋白质的特性进行分析选择去垢剂种类和浓度。而由于何种去垢剂适应作用于何种蛋白质现在很难精准预测，所以一个更为切实可行的办法就是通过具体实验筛选合适的去垢剂种类和浓度。

2) 蛋白 A 是一个葡萄球菌蛋白，它能与抗体分子的恒定区相结合，其亲和力依赖于物种和抗体的亚型。蛋白 G 与其相似，对不同的抗体其亲和力变化较大，也可利用。通常针对兔源的捕获抗体用蛋白 A，而鼠源的捕获抗体用蛋白 G。在整个章节中，PAGS 即蛋白 A 琼脂糖或蛋白 G 琼脂糖，Santa Cruz 公司也提供同时蛋白 A 和 G 的混合琼脂。

3) 也可用本身就能表达目标蛋白的一些细胞系或组织来代替使用转染细胞进行免疫沉淀实验。这种方法的优点是可避免蛋白质的过度表达，促进更自然的亚细胞定位以及翻译后修饰，并减少外来的连接和标签序列。然而，进行这些实验通常都较为困难，因为这要求细胞表达所有目标蛋白的水平都要足够高，还需要高质量的捕获抗体，除此之外还经常缺乏很好的阴性对照。本章提供的方案是一些基本步骤，但需要对待选的多种细胞系、多种捕获抗体，以及与属源及同种型匹配都不相关的捕获抗体进行测试，从而帮助确定目标蛋白是否能与其特异性结合。另外，假若蛋白质与蛋白质的相互作用被认为受到药物处理或细

胞培养条件的影响，这在免疫沉淀分析中应该验证。

4）由于 PAGS 预结合常被省略，并且对照组（单独转染组或 IgG-IP 组）的设立也能排除 PAGS 的非特异结合。最佳使用量在不同的系统有所不同，可根据经验来选择。这里说明一下对 PAGS 处理的一些技术细节。因为缓冲液易挥发，所以在从贮存瓶底取出小珠前，短暂离心后，检查小球的体积与存储缓冲液是否相等。若不相等，可加入相应体积缓冲液。在吸取悬液时，枪头应尽量大一些或用刀切去枪头尖端的一段。PAGS 在离心时很容易受损，因此离心时速度要低或用半径小的离心机。在清洗过程中，不要让小珠干燥。最后，一次实验的需要量要恰好够，长期储存的细胞总蛋白会缓慢降解，导致不能检测到可能存在的蛋白质相互作用。常用来进行免疫沉淀和 Western 印迹的 IgG 抗体是由两条重链（每条大约 50kDa）和两条轻链（每条大约 25kDa）通过二硫键结合在一起的异四聚体。为了收集到目标蛋白复合体而对 PAGS 煮沸时，大多数抗体将一起洗脱，这会导致在最后的样品里含有大量的抗体。假若洗脱缓冲液里有还原剂，大多数 50kDa 及 25kDa 的抗体将会存在，否则，将主要出现大约 150kDa 已还原的抗体，但仍有许多 50kDa 及 25kDa 的抗体。这在进行 Western 印迹时可能会出现问题，因为用于 Western 印迹的二抗通常是用辣根过氧化物酶偶联的 IgG 抗体。假若所使用的捕获抗体以及 Western 印迹用的一抗来源于同一属源，那些被一起洗脱的捕获抗体的信号强度就会很高，因此，应尽量使用不同属源的抗体。即使这样，来自不同属源的抗 IgG 的 Western 印迹二抗通常有交叉反应。假若通过添加或去除洗脱液中的还原剂也不能克服这个问题，可采用以下 3 种方法：①让其跑更长的胶以使目标蛋白与捕获抗体充分分离；②使用一个能与小珠共价相连的捕获抗体；③最有效的是购买 eBioscience 公司的 True Blot 二抗，该二抗只识别双链抗体，可有效避免免疫共沉淀的一抗重链和轻链条带干扰，但同时 True Blot 二抗的显示目标条带的能力也比普通二抗弱。

第五节　印迹叠加和 Far Western 印迹法原理与应用

一、印迹叠加和 Far Western 印迹法原理

印迹叠加（blot overlay）是一种研究蛋白质-蛋白质直接相互作用的有效方法。这项技术包括在 SDS-PAGE 中分离蛋白质，蛋白质杂交到硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上，然后与探针一起孵育。探针一般是放射性核素或生物素标记的蛋白质，或是可视化的特异抗体。如果是用抗体作为探针，这项技术称为 Far Western 印迹。许多种类的蛋白质相互作用都能采用印迹叠加技术来研究，这项技术可用于筛选未知的蛋白质-蛋白质相互作用，也可详细研究已知的蛋白质-蛋白质相互作用。

在准备 SDS-PAGE 时，蛋白质会发生还原和变性。许多蛋白质-蛋白质的相互作用依赖于蛋白质的二级和三级结构，但这些结构通常在还原和变性的环境中被破坏了。因

此样品经过 SDS-PAGE 样品缓冲液处理后，似乎应该几乎不存在蛋白质-蛋白质相互作用。然而，众所周知，即使在其中一个蛋白质被还原、变性，SDS-PAGE 和 Western 印迹后，仍然存在多种蛋白质-蛋白质相互作用，这种蛋白质相互作用多依赖于蛋白质的一级结构。印迹叠加技术是研究这种蛋白质相互作用的一种标准且非常有用的方法。

从原理上来说，印迹叠加与 Western 印迹相似。这两种方法都是样品在 SDS-PAGE 胶上根据分子质量分离，然后转移到硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上，再用可能与目标蛋白相互作用的蛋白质（与一个或多个固定在膜上的蛋白质结合）叠加（overlay）。Western 印迹中，叠加蛋白质为抗体，以检测目标蛋白表达丰度。在印迹叠加时，孵育的蛋白质是感兴趣的探针，以验证是否存在相互作用。叠加的探针可以通过以下方法来检测：与抗体孵育（这一方法常称为 Far Western 印迹）；与亲和素一起孵育（如果探针是生物素标记的）；叠加探针是^{32}P 标记的，用放射性自显影方法。与 Western 印迹不同的是，Far Western 印迹用来检测可能相互作用的蛋白质，而 Western 印迹只是检测目标蛋白的丰度。下文将讨论的是 Far Western 印迹技术，检测可溶性 GST-TAK1 羧基端融合蛋白与印迹膜上带有 6 个组氨酸标签的 Tab1 融合蛋白的结合情况。当然，该方法也适用于许多其他蛋白质。

二、印迹叠加和 Far Western 印迹应用

该技术用于证实从酵母双杂交、免疫共沉淀发现的相互作用分子是直接相互作用。缺点是只有比较强的蛋白质相互作用才适合用印迹叠加技术检测。上面描述的实验步骤是为深入研究已知的蛋白质-蛋白质相互作用而设计的。然而，印迹叠加也可用于早期筛选研究，以发现新的蛋白质-蛋白质相互作用。进行 SDS-PAGE 的应该是组织总蛋白而不是纯化的融合蛋白，再加入感兴趣的探针叠加，以此确定可能与探针蛋白质相互作用的蛋白质分子质量。这项技术的优点在于：①许多组织样品能在同一张膜上筛选；②能够立即确定与探针相互作用的蛋白质的分子质量和组织分布。这项技术的缺点是：①因为其过程中有多次的冲洗，所以只能用于检测亲和力高的相互作用；②能否检测到与探针相互作用的蛋白质还依赖于该蛋白质在组织中的表达水平；③如果蛋白质之间的相互作用依赖于两者的构象，这种相互作用将不会被检测到。有些探针可与印迹膜上的蛋白质发生广泛的非特异性结合，进行叠加实验时探针与蛋白质的特异结合就必须要有阴性对照。当印迹蛋白是 GST 融合蛋白时，GST 本身就是很好的阴性对照。当印迹膜上的蛋白质是 His 融合蛋白时，需要一种或多种不与探针结合的 His 融合蛋白在同一张印迹膜上作为阴性对照。这样就可以很好地展现蛋白质间的特异性结合，而且排除了标签造成的非特异性结合。同样也可以是将全细胞总蛋白作为探针孵育，然后用预测的可能发生相互作用分子抗体检测。这个方法需要全程保持 4℃，避免全细胞总蛋白的降解。

本章介绍的第一种方法是用抗体检测探针，常称为 Far Western 印迹。第二种方法是生物素标记探针，然后用亲和素/酶偶联复合物来检测。由于生物素-亲和素结合是已知最强的亲和结合之一，所以这种方法的好处在于很敏感。但主要的缺点是用生物素标记探针后，可能改变探针原来的特性，因而可能破坏探针蛋白质原本具有的与某种蛋白

质结合的能力。第三种方法是^{32}P标记检测磷酸化的探针，从而使探针具有放射性。该方法的优点是一旦探针与印迹结合，无须其他的检测步骤（如无须再与抗体或亲和素孵育）。这样就减少了冲洗次数，有助于检测到低亲和力的蛋白质-蛋白质相互作用。该方法的主要缺点是：①放射性探针需要特殊处理；②与生物素标记类似，探针磷酸化后可能改变原来的特点，导致某些蛋白质-蛋白质相互作用被破坏。蛋白质之间相互作用的检测过程完全是可调换的。两个蛋白质中的任何一个都可以固定在印迹膜上，用另一个做探针。许多其他蛋白质-蛋白质相互作用的检测过程也是可调换模式的，但有一些反应只能单向检测，这是因为这种相互作用需要其中一个蛋白质保持其自然的构象。已知蛋白质-蛋白质相互作用的亲和力可以通过印迹叠加饱和结合曲线估计而得。这种方法需要提高叠加探针的浓度直至达到最大特异性结合。

第六节 Far Western 印迹法应用实例

本节以验证 TAK1-GST 蛋白与 Tab1-His 融合蛋白的相互作用举例说明 Far Western 印迹过程。

材料与试剂

Western 印迹器材与缓冲液（参见第二十一章、第二十二章）

纯化的 His 标签的 Tab1 融合蛋白，纯化的 GST 标签的 TAK1 融合蛋白（eBiosource），抗 His 单克隆抗体（Santa Cruz biotechnology）

步骤

1. 电泳与转膜

这一步的目标是把样品中 TAK1-GST 融合蛋白成分固定在硝酸纤维素膜或类似的基质（如 PVDF 膜）上。电泳与转膜过程参见本身相应章节，在转移过程中的所有操作都必须保持印迹膜的干净，这是非常关键的，因为污染物会导致探针显影时背景增加。

2. 叠加

在叠加步骤中，探针与印迹膜一起孵育，未结合的探针会被洗掉。叠加能否成功在很大程度上取决于叠加探针的纯度。GST 标签的融合蛋白和 His 标签的融合蛋白应该尽可能地纯化。如果探针中含有许多污染物，那么就会增加检测时的背景噪声，从而使特异结合的探针显影更加困难。

1）在封闭液中封闭印迹膜至少 30min（见注意事项）。

2）在合适体积的封闭液（根据膜大小用量为 0.5～5ml）中加入 Tab1-His 融合蛋白，至终浓度 5～25nmol/L。

3）Tab1-His 融合蛋白与印迹膜共孵育 1h，室温、轻摇。

4）倒掉含 Tab1-His 融合蛋白的封闭溶液，用 10ml TBST 洗 5min，轻摇重复 3 次。

5）在 0.5～5ml 封闭液中加入 1∶1000 稀释的抗 His 抗体，终浓度为 50～200ng/ml。

6）抗 His 抗体与印迹膜孵育 1h，缓慢摇动。

7）倒掉含有抗 His 抗体的溶液，用 10ml 的 TBST 洗膜 5min，轻摇重复 3 次。

8）以 1∶2000 的稀释比例将辣根过氧化物酶偶联的二抗加至 0.5～5ml 封闭液中。

9）二抗孵育 1h，缓慢摇动。

10）倒掉二抗孵育液，用 10ml 的 TBST 洗膜 5min，轻摇重复 3 次。

3. 检测叠加蛋白质

叠加的最后一步是检测与固定在膜上的蛋白质特异结合的探针，即 Tab1-His。在检测可视化探针（如 ^{32}P 标记的 Tab1）时，应该努力寻找尽可能最好的信噪比。背景的非特异结合增加与曝光时间成线性相关。因此，更短曝光时间也许会得到更满意的信噪比。

注意事项

在每次叠加实验中，封闭印迹是相当重要的一步。它的主要目标是封闭印迹膜上潜在的非特异性蛋白质结合位点，从最大限度地减少探针的非特异性结合。当观察到大量的非特异性背景结合时，应延长封闭时间或提高牛奶浓度，以减少非特异结合的发生。有些研究者喜欢用牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）或其他蛋白质取代牛奶来封闭，因为牛奶中含有的酪蛋白会结合磷酸化位点，从而影响磷酸化抗体以及相互作用分子的检测。

第七节　GST pull-down 实验

GST pull-down 实验与印迹叠加一样，能进一步证实免疫共沉淀的蛋白质相互作用蛋白质是直接结合，而不是由其他蛋白质介导的。GST 融合蛋白能够用于研究蛋白质-蛋白质直接相互作用的主要原因是 GST 与谷胱甘肽有高亲和力，这样大量 GST 融合蛋白就能与固定在基质上的谷胱甘肽结合。更重要的是，谷胱甘肽与 GST 的结合力是相当强的，不能被一般的缓冲液解离。GST 与嵌合的蛋白质之间有一段长的柔性连接段，使得 GST 和目标蛋白形成两个各自独立的功能域，因此 GST 并不阻碍其他蛋白质与融合蛋白的相互作用。利用 GST 融合蛋白的这些特点，可以用固定在基质上的谷胱甘肽将 GST 融合蛋白简单、高效地亲和层析出来，因而许多研究者已经把它作为分离新的相互作用蛋白质的一种工具。在本节中，用在 *E.coli* 中表达的 GST-TAK1 和在哺乳动物细胞中表达的 Tab1-HA 来举例说明利用 GST pull-down 实验来研究蛋白质-蛋白质相互作用。

GST pull-down 实验与印迹叠加一样，能进一步证实免疫共沉淀的蛋白质相互作用蛋白质是直接结合，而不是由其他蛋白介导的。缺点是表达蛋白质过程比较复杂，并且只有蛋白质之间的比较强的直接相互作用才适合 GST pull-down 技术。

材料与试剂

GST-TAK1 蛋白（eBioscience），谷胱甘肽（glutathione，GSH）、还原型谷胱甘

肽（Sigma），Cocktail 蛋白酶抑制剂（Pierce），脂质体转染试剂（Invitrogen）

抗体：抗 C-Tab1 抗体、抗 His 抗体、抗 GST 抗体（Santa Cruz）

RIPA 裂解缓冲液（CST 公司，配方详见本章第二节）

洗脱缓冲液：50mmol/L Tris-HCl，pH8.0 100mmol/L NaCl，10mmol/L 还原型谷胱甘肽，1mmol/L DTT

步骤

使用 GST-TAK1 来分析与 Tab1 的相互作用：为了进一步证实 TAK1 能够直接结合 Tab1，将分析原核表达的 GST-TAK1 融合蛋白和人胚肾细胞株 HEK293 表达的 Tab1-His 融合蛋白的相互作用。

1）2～4μg 的 Tab1-His 质粒转染 6 孔板的 HEK293 细胞，生长 48h。详见第四节收集细胞总蛋白。

2）于 2 个 1.5ml 离心管中分别加入 0.5～2μg 的 GST 和 GST- TAK1 融合蛋白，然后加入步骤 1 所得 500～1000μg 细胞总蛋白，4℃摇床上混匀 2～4h。

3）每管加入 10～15μl 的谷胱甘肽-琼脂糖，继续摇 0.5～1h。

4）用 1ml 的洗脱缓冲液，轻摇后 6000～8000g 离心 30～60s，弃去上清，重复 3～6次。

5）加入 10～30μl 的 2×SDS 样品缓冲液，煮沸 1～5min 等待 Western 印迹检测。

6）然后样品进行 SDS-PAGE，用抗 His 或 Tab1 抗体检测 GST-TAK1 结合的 Tab1-His。

注意事项

高浓度 GST 蛋白本身具有自发荧光，因此实验中尽量用低剂量的 GST 融合蛋白，避免 GST 自发荧光的干扰。能够在哺乳动物细胞中表达的商品化 GST 融合蛋白表达载体数目十分有限。使用哺乳动物细胞表达真核蛋白的优点是可以得到经过修饰的蛋白质。更重要的是，许多典型的不能在 *E. coli* 中表达的蛋白质或在 *E. coli* 中易于降解或者形成包含体的蛋白质在哺乳细胞中却能正常表达。载体 pEBG-3X（pEBG-3X-HV）包含了 E1Fa 启动子，启动表达 GST 融合蛋白，同时加入更多的限制性酶切位点。用 pEBG-3X-HV 转染 10cm 平皿的 HEK293 细胞能产生多达 5～10μg 的 GST 蛋白，比基于巨细胞病毒启动子的载体表达的蛋白质量要多。使用谷胱甘肽-琼脂糖纯化来源于动物细胞的 GST 融合蛋白就无需使用抗体，无需用免疫沉淀纯化，从而避免用煮沸的方法才能释放出抗体。由于 GST 融合蛋白可以用谷胱甘肽很容易地洗脱下来，而不需要使用抗体，从而避免大量抗体的污染。需要注意的是，纯化哺乳动物细胞表达的 GST 融合蛋白与原核中的方法是一样的。除了裂解细胞时，可以使用 1％Triton X-100 或 1％的 NP-40 来代替 French Press 或超声搅拌器。

第八节　BIAcore 技术

一、BIAcore 技术原理

基于表面等离子共振（surface plasmon resonance，SPR）的 BIAcore 技术原理是固定在传感器芯片固相表面上的蛋白质，随着液体流动相中捕获蛋白质量的增加，其表面的光学特征也随之变化，这是实时信号转导的载体。芯片结构是在玻璃片上覆盖了一层金膜，各种类型的芯片在金膜表面连有不同的多聚物以形成不同的表面环境，利于固定不同性质的生物分子。实验时先将一种生物分子固定在传感器芯片表面，将与之相互作用的分子溶于溶液流过芯片表面。检测器能跟踪检测溶液中的分子与芯片表面的分子结合、解离整个过程的变化。目前传感器芯片的种类有 10 余种。根据传感器芯片表面的物理化学特性适合偶联不同的蛋白质或其他生物大分子。一张传感器芯片固定偶联同一种蛋白质或其他生物大分子，可反复使用 10 次以上。传感器芯片偶联细胞时则需要保证细胞的数量和结构的完整。传感片 CM5 是用途最广的芯片：其覆盖了一层葡聚糖。带有化学基团，如—NH_2、—SH、—CHO、—OH、—COOH 的生物分子可通过化学反应，以共价键偶联的方式与葡聚糖上的羧基偶联。从而使生物分子偶联到传感片表面。

二、BIAcore 芯片分类

1. 适用于捕获生物素标记的肽片段、蛋白质、DNA 的传感片 SA

传感片 SA 表面覆盖了一层链霉抗生物素（streptavidin），能与被生物素标记的分子质量大小各异的肽片段、蛋白质、DNA 结合，是研究 DNA-DNA、RNA-DNA、RNA-蛋白质间相互作用的理想芯片。

2. 通过金属螯合作用捕获配体的传感片 NTA

传感片 NTA 表面偶联了氨三乙酸（NTA），通过镍组氨酸修饰离子螯合作用将末端组氨酸修饰的生物分子连接到芯片表面。类似组氨酸修饰的亲和层析，组氨酸修饰在生物分子的末端，因此用这个办法将生物分子连接到芯片，可以很好地保持生物分子的空间结构。

3. 适用于构建细胞膜研究模型的传感片 HPA

传感片 HPA 提供了一个疏水表面，研究者可方便地在芯片表面铺上脂质体。要研究的受体就嵌在磷酸分子层中，因此 HPA 芯片是研究细胞膜受体在膜环境中与配体相互作用的理想芯片。

4. 直接抓住细胞的传感片 L1

传感片 L1 表面由亲脂的葡聚糖化合物组成，该化合物能直接插入磷脂双分子层将脂质体或细胞抓获到芯片表面。可研究位于与膜内外或跨膜的蛋白质、受体等，是研究膜蛋白信号转导的理想芯片。

三、BIAcore 技术应用

BIAcore 技术为实时研究蛋白质相互作用提供了强有力的手段。该技术能够定量比较蛋白质相互作用的特异性、动力学特性和亲和力大小，避免了其他一些方法的复杂性。能够实时地检测到这种变化，因此能够同时得到蛋白质相互作用的动力学参数。对结合过程进行恰当的时程分析就能够确定结合常数；通过流动相中去掉结合伴侣分子就能够获得解离常数。同样通过在稳定状态下的结合数据，就可以确定结合等温曲线，从而能够从热力学角度确定平衡解离常数。该方法具有以下特点：实时检测各种生物分子间的相互作用，如蛋白质-蛋白质、DNA-蛋白质、DNA-DNA 等；无需标记，定量计算生物分子结合的亲和力和动力学；专为与质谱联合使用而优化，是蛋白质功能研究和天然药物活性成分研究的解决方案；检测灵敏度高，直接检测相对分子质量大于180kDa 的小分子，是小分子药物筛选的先导化合物优化的理想技术；完全自动化，直接检测混合物，如血清、细胞裂解液、组织匀浆等；出实验结果又快又简单。但是仪器昂贵，目前国内尚只有 30 多台机器，包括较早型号的 BIAcore T100 和新型的 BIAcore 3000。

第九节　BIAcore 技术应用实例

以下用证实 XIAP（X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein）的 BIR1 结构域和 Tab1 氨基端 1～370 位序列（Tab1N）的相互作用，举例说明 BIAcore 技术过程。

材料与试剂

缓冲液和溶液：EDC［0.2mol/L 的 *N*-乙基-*N'*-(二甲氨基丙基)-碳化二亚胺的水溶液］；NHS（0.05mol/L 的 *N*-羟基琥珀酰亚胺水溶液）；氨基乙醇（1mol/L 盐酸乙醇胺，用 NaOH 调节至 pH8.5）；Extraclean 是一种用于表面再生的溶液；以上试剂都可从 BIAcore 购得

HEPES 缓冲的盐水缓冲液，10mmol/L HEPES（pH7.4），150mmol/L NaCl 3mmol/L EDTA；0.005%（体积比）Tween 20；HCl（20mmol/L）

蛋白质：这里研究 XIAP 的 BIR1 结构域和 Tab1 氨基端 1～370 位序列（Tab1N）的相互作用，这些实验样品对于 SPR 方法十分关键，必须仔细配制蛋白质样品和试剂，以便能够得到实验所要求的成分和纯度［见注意事项 1)］。

专用装置：BIAcore 仪器、BIAcore 控制软件和 BIA 评价软件

步骤

1. 链亲生物素交联于 SPR 芯片

首先配置流动相液体，分析蛋白质-蛋白质相互作用时，有一点是非常重要的，测试蛋白质务必要在和运行溶液相同的溶液里配制。否则，蛋白质样品的进样就会由于总折射率变化（由于溶液组成不同）而产生信号，并且和蛋白质-蛋白质相互作用的信号

混杂在一起。为了在实验过程中尽可能保持高蛋白质浓度，最好对层析进行分步处理，而不是批量处理样品。下面介绍一个用这种方法处理 300μl 体积的 Tab1N 蛋白样品的实例。链亲生物素（streptavidin）的交联是按照标准的 NHS/EDC 氨基偶联方法在流动相溶液中完成的。使用 BIAcore 仪时，这些步骤是通过一系列自动抽样和进样程序来完成的。溶液和样品在试管里配制好后，放到仪器的自动进样装置里，然后就进入自动操作步骤。交联反应的步骤如下。

1）首先，用含有 25mmol/L NHS 的 0.1mol/L EDC 水溶液以 5μl/min 的进样速度活化芯片表面，持续 5min。两个分别含有 150μl 0.2mol/L NHS 和 150μl 50mmol/L EDC 的小管以及一个空管放置在仪器里。用自动取样装置，从盛有交联试剂的两个小管中各取 100μl 溶液，放到空管里混合，然后从混合管中取 25μl 溶液进样。

2）将用 pH4.8 的 100mmol/L 乙酸钠配置的 0.1～0.3mg/ml 的链亲生物素进样，持续 5min；150μl 稀释的链亲生物素放在进样管里，交联反应时取出 25μl 进样。

3）用 1mol/L 乙醇胺水溶液将活化的羧基淬灭，持续 4min；150μl 1mol/L 乙醇胺放在进样管里，每次进样 20μl [见注意事项 2)]。

2. 将 BIR1 蛋白固定到链亲生物素修饰的 SPR 芯片上

1）两个二价的阳离子对于链亲和素与糖类的结合是十分关键的，只有它存在才能保证视 BIR1 结合在链亲和素上。在 10min 的检测时间里，流动相中 10μmol/L 的 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 就可以阻止 BIR1 从链亲和素上解离下来。

2）进样前，先将稀释的 BIR1 预热至 20℃，并保持 1～2min。由于 BIR1 和链亲和素的结合属于慢反应，而且实验策略是用过量的 BIR1 来饱和链亲和素，因此将样品流速降低到 2μl/min 来保持交联反应所需的受体量。作用时间一般为 25min，以使链亲和素的结合平衡达到饱和。然后将流速调回到 5μl/min，洗去未结合的 BIR1。

在开始阶段，低 pH（pH6.0）的 BIR1 稀释液有助于 BIR1 与羧甲基葡聚糖凝胶上的羧基间的离子相互作用，使 BIR1 浓缩并结合到链亲和素上。从达到平衡的指数变化速率可以明显看出 BIR1 和链亲和素的结合是缓慢的。注意大部分结合的 BIR1 在整个实验过程中仍旧结合在固定化的链亲和素上 [见注意事项 3)]。

3. 检测

1）Tab1N 与固定化 BIR1 的协同结合。通常在 SPR 实验中，Tab1N 以 5μl/min 流速加样到链亲和素-BIR1 芯片表面。这样的流速满足了动力学研究需要快速混合流动通道的要求，通常 60μl 的体积在 3s 内达到平衡，但也适当降低了分析结合作用所需要的 Tab1N 蛋白浓度。对于疏水性的二聚体的缓慢结合反应来说，5μl/min 显然已经足以做动力学分析。

2）Tab1N 与固定化 BIR1 的平衡解离常数。Tab1N 与固定化 BIR1 的结合达到平衡的速度很快。其平衡过程在样品以 5μl/min 流速在流动通道中混合的时间里

就已经完成。因此，Tab1N 与固定化 BIR1 相互作用的动力学过程还没有深入研究。然而，结合平衡是容易得到的，在实验中通过改变进样中游离 Tab1N 浓度就可以获得这些数据。这种实验方法也可用于协同结合，得到各自的结合常数。将其中一个亚基的浓度保持恒定，再改变另一个亚基的浓度来测定 BIR1 的结合饱和度。

4. 再生芯片表面

应用生物传感器的实验中，大多数实验策略是反复多次的链亲和素的结合和解离。在每一次实验之前，已结合的链亲和素必须能够从芯片上彻底解离下来，不能有残留或者只能是检测不到的量，以免影响下一次循环的重新结合能力。目前 GE 公司提供了方便生物素和链亲和素标记试剂盒（Biotin CAPture Kit & Biotin CAPture Kit Series S），Biotin CAPture 试剂包含了与单链 DNA 分子互补的链亲和素结合物。Biotin CAPture 试剂注射并杂交到表面，接着注射并捕获生物素化配体，随后注射分析样品。传感芯片表面的再生过程也很简单，只需打断杂交的 DNA 寡核苷酸，即可用于下一次的循环。

注意事项

1）通过等电聚焦或者使用软件预测，确定待分析蛋白质的等电点。对等电点高于 7 或者小于 3 的蛋白质一般不推荐进行 BIAcore 分析，特殊需求可与相关技术人员进行个例商讨。固定于传感片上的靶蛋白（如受体蛋白）和待分析蛋白，纯度要达到 95%以上。用 PBS（或者蛋白质所需的特殊缓冲液）对蛋白质溶液进行透析，然后装在冷冻微离心管中以最大速率离心，并经 0.22μm 滤膜滤过。根据所求得的待测蛋白质或肽的消光系数，在 280nm 测定吸光度来计算最终的蛋白浓度，然后浓缩至 200μg/ml～1mg/ml 的浓度。

2）注意含有高溶质浓度的溶液，特别是 1mol/L 乙醇胺，会产生非常大的 SPR 信号，这是由于这种溶液与流动相溶液的总折光率存在差异。通过一系列的动力学特性可以很容易地将这种信号与蛋白质-蛋白质相互作用的信号区分开来。由总折光率引起的信号与两种溶液的混合具有时程关系（5μl/min 流速，达到平衡大约需要 3s），并且有方波的特性。这与在第二步骤中链亲生物素的有限扩散交联到羧甲基葡聚糖上的信号明显不同，后者具有指数方式达到平衡的曲线形状。还要注意到，洗去交联试剂后，SPR 信号基线仍比交联反应前的高。根据这个数值可计算出共价交联到葡聚糖层的链亲生物素的量。为了使基线稳定，常规需要用流动相溶液以 5μl/min 的流速清洗亲和素表面 30～60min，以便在固定化 BIR1 之前使链亲生物素稳定。

3）设计了实验步骤限制固定化生物素的量以减少 Tab1N 蛋白和生物素之间的非特异性相互作用。最为严重的是，如果芯片反复暴露在去污剂中或一次性暴露在致变性浓度的去污剂中会损害 BIR1。在实验中都使用胆酸钠或 CHAPS 作为去污剂溶解 BIR1 蛋白，而且通常将样品中的去污剂浓度控制在 800μmol/L 以下，暴露时间在 5min 以内。由于芯片表面易损，通常在实验中每一个芯片只使用

一天，每次实验都用新合成的表面。

（韩超峰）

参考文献

黄培堂．2002. 分子克隆实验指南．北京：科学出版社．

李慎涛．2007. 精编蛋白质科学实验指南．北京：科学出版社．

张幼怡．2008. 蛋白质-蛋白质相互作用：方法与应用．北京：北京大学医学出版社.

Blonska M, Shambharkar PB, Kobayashi M. 2005. TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation. J Biol Chem, 280: 43056～43063.

Fu H. 2004. Protein-protein Interaction: Methods and Applications. Humana Press.

Garcia-Cuellar MP, Mederer D, Slany RK. 2009. Identification of protein interaction partners by the yeast two-hybrid system. Methods Mol Biol, 538: 347～367.

Kittanakom S, Chuk M, Wong V. 2009. Analysis of membrane protein complexes using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid (MYTH) system. Methods Mol Biol, 548: 247～271.

Liu Q, Busby JC, Molkentin JD. 2009. Interaction between TAK1-TAB1-TAB2 and RCAN1-calcineurin defines a signalling nodal control point. Nat Cell Biol, 11: 154～161.

Lu M, Lin SC, Huang Y. 2007. XIAP induces NF-κB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. Mol Cell, 26: 689～702.

Murphy M, Jason-Moller L, Bruno J. 2006. Using Biacore to measure the binding kinetics of an antibody-antigen interaction. Curr Protoc Protein Sci, 2006, Chapter 19: Unit 19. 14.

Park S, Rath O, Beach S, et al. 2006. Regulation of RKIP binding to the N-region of the Raf-1 kinase. FEBS Lett, 580: 6405～6412.

第二十四章　免疫学常规实验技术

抗原抗体反应（antigen-antibody reaction）是免疫学理论的基本原理，是指抗原物质刺激机体产生相应的抗体后，两者发生特异性结合的反应。抗原抗体反应可产生溶菌、杀菌、毒素中和及增强机体免疫吞噬效应；但有时也可引起机体的超敏反应或其他免疫性疾病，对机体造成不利影响。传统的免疫学方法是用体液免疫产生的抗体与各种抗原进行的体外反应，因抗体主要存在于血清中，在抗原或抗体的检测中多采用血清做试验，故体外抗原抗体反应又称为血清学反应。后来，随着单克隆抗体和基因工程抗体技术的建立及广泛应用，抗体的来源已不再仅局限于动物血清。同时，抗原抗体反应也常用于各种免疫细胞表面抗原和受体的分析与鉴定，因此，血清学反应一词已为广义的抗原抗体反应所取代。

在抗原抗体反应中，因抗原的物理性状或参与反应的成分不同可出现多种反应，如凝集、沉淀、补体结合及中和反应等。此 4 种类型的反应即所谓经典的抗原抗体反应，已被广泛地应用于机体的体液免疫应答、抗原与抗体的特性以及疾病的辅助诊断。随着高新技术在免疫学的应用，以抗原抗体反应为基础的现代免疫学实验技术，已逐步成为当今生命科学各个领域中重要的研究手段，推动着生命科学的发展。

第一节　概　　述

抗原与抗体之间发生的特异性结合，主要是根据两者的分子结构及立体构型的互补性，以及由数种因素引起抗原与抗体分子间引力作用下发生的一种免疫反应，是一种可逆性反应。

一、基本原理

（一）抗原抗体的胶体特性与极性基的吸附作用

抗体是免疫球蛋白，大部分抗原亦属于蛋白质，都带有电荷。蛋白质含有氨基和羧基等强极性基团和水分子之间存在有很强的亲和力，继而在其外周构成水化膜，这样使蛋白质成为亲水胶体。一种胶体在 pH 一定的溶液中带有相同电荷，产生互相排斥现象。因亲水胶体带有水化膜和电荷，故可保持相对稳定，不发生凝集或沉淀。

抗原与抗体之间存在相对应的极性基，当它们在物理和化学特性相互吸引的在作用下发生结合时，就失去了与水分子的结合，成为疏水胶体。这时它们在溶液中的稳定性，主要依赖其表面所带的电荷。此时，如若在一定浓度的电解质，如 NaCl 存在的情况下，可以中和胶体粒子表面所带电荷则被中和，胶体粒子则发生凝集或沉淀反应，形

成肉眼可见抗原-抗体复合物。

（二）抗原抗体结合力

抗原与抗体由于立体构象的互补性形成特异性结合，但这种结合是非共价键结合，不牢固。抗原抗体之间的牢固的结合主要是靠下列各种分子间的共价结合而形成的。

1. 库伦吸引作用或静电力作用

在抗原和抗体分子上带有氨基（$—NH_3^+$）和羧基（$—COO^-$），由于两种电荷相反，相互吸引而促进结合。此外，抗原与抗体间所带的相反电荷，可互相吸引而促进结合。这种引力和两电荷间的距离的平方成反比。

2. 范德华引力

在抗原与抗体分子的外层轨道上存在大量的电子，它们之间相互吸引，发生结合。这种结合的大小取决于分子空间构型，抗原与抗体分子的互补空间关系可增强该引力的发挥，形成特异性抗原-抗体复合物。

3. 氢键结合

主要借助分子中的氢原子和电负性大的原子如氮、氧等相互吸引而形成的。具有亲水基团，如—OH、$—NH_2$及—COOH 的抗体与相对应的抗原相互接近时，可形成氢键桥梁，通过氢键使抗原与抗体相互结合。氢键结合比范德华引力的结合力强，并更具有特异性，因为只有存在互补的供氢者和接受者才能实现氢键结合。

4. 疏水作用

由于抗原与抗体分子侧链上的某些非极性氨基酸，如亮氨酸、缬氨酸及苯丙氨酸等为疏水氨基酸，与水分子之间不形成氢键。当抗原与抗体分子表面上的疏水基团相互接触时，由于相互排斥水分子，在两者之间产生相互吸引力而发生结合。其中，疏水作用力在抗原抗体反应中的作用最大，约占总结合力的一半以上。

二、抗原抗体反应的特点

（一）特异性

特异性是抗原抗体反应的最重要特征之一。抗原与抗体反应有高度特异性，即一种抗原分子只能与由它刺激产生的抗体结合而发生反应。抗原抗体的结合实质上是抗原表位与抗体超变区中抗原结合点之间的结合。抗原特异性主要取决于抗原决定簇的数量、性质及其立体构型；抗体的特异性则取决于 Ig Fab 段的高变区与相应抗原决定簇的结合能力。但由于抗原成分较复杂，常含有多种抗原决定簇，可以刺激机体分别产生针对不同表位的抗体，即多克隆抗体。如果两种不同的抗原分子上有相同的抗原表位，或抗原、抗体间构型部分相同，都可出现交叉反应。发生交叉反应的原因主要有下列两种。

1. 抗原不纯

大多数免疫性抗原常是由数种不同抗原分子组成的混合物，特别是细胞性抗原大多

含有多种抗原成分，即使是部分提纯的抗原，往往也混有少量杂蛋白。由这些抗原免疫机体会产生非单一的抗体，而用这种抗体就可与含有同类抗原的各种物质起反应，表现出非特异的交叉反应。例如，通常注射T淋巴细胞或胸腺细胞制备抗淋巴细胞血清或抗胸腺细胞免疫球蛋白时，因免疫剂中混有红细胞，也可同时产生抗红细胞抗体，而发生交叉反应。制备抗机体其他组织成分的诊断血清时，也常因混杂有血清蛋白或红细胞、白细胞成分而出现交叉反应。

2. 共同抗原

数种抗原物质可能含有部分共同的或相似的抗原决定簇，由它们免疫产生的抗体，对于与它们共同的抗原即可发生交叉反应。例如，伤寒患者的血清除主要凝集伤寒杆菌外，又可轻度凝集副伤寒杆菌及其他沙门杆菌；又如斑疹伤寒患者血清除能中和斑疹伤寒立克次体外，又可与变形杆菌 Ox_{19} 株发生 Weil-Felix 反应，这都因为它们之间含有共同抗原。

交叉反应抗体可用吸收法去除。即将交叉反应的抗原加于免疫血清中，待与其中交叉反应抗体结合成复合物后，离心除去该抗原-抗体复合物沉淀，即可获得吸收提纯的血清，其中只含所需要的主要抗体。但需注意，用吸收法提纯免疫血清时，应先取部分样品加小量交叉抗原试验，未吸收完全者，逐步增量再试，至交叉抗体全被吸除时为止，然后按所用的交叉抗原总量对一定量免疫血清进行正式吸收。

如果吸收用的交叉抗原是可溶性成分，也可将其黏附于细菌或红细胞表面，然后加入免疫血清，待与交叉抗体凝集成大体积复合物时，即易被除去。最好是将交叉抗原以共价键结合于琼脂糖珠上，装入层析柱内，然后将含有交叉抗体的免疫血清通过层析柱过滤，如此则交叉抗体皆黏附于琼脂糖珠的交叉抗原上，滤过的血清即只含所需的主要抗体，此法称为亲和层析法，效果最佳。

通常用单克隆抗体（monoclonal antibody）血清做试验，特异性较高。目前，针对单一抗原决定簇的单克隆抗体和基因工程抗体的研制成功，进一步提高了抗原抗体反应的特异性。

（二）部分可逆性

抗原与抗体的结合仅是分子表面的结合，而非共价键结合。这种结合虽具有相对稳定性，但在一定条件下，如高温、低 pH、冻融、高浓度盐类或抗原、抗体浓度过高等，使已结合的抗原和抗体发生解离。

（三）最适比例性

抗原与抗体需有一定的比例时才出现特异性结合反应。寻找适当比例的试验有两种方法：①将抗原进行稀释，加定量的抗血清；②将抗血清进行稀释，加定量的抗原。最高稀释倍数的抗血清或抗原仍出现反应者称为该抗血清或抗原的效价（或滴度）。按抗原抗体相对比例大致分为抗体过剩区，又称前带（prozone）；两者浓度大致相等的平衡区，又称等价带（zone of equivalence）和抗原过剩区，又称后带（postzone）。在免疫学检测中，当以定量抗原测定抗体时，如抗体浓度大于抗原当量浓度，形成的免疫复合

物（IC）反而减少。抗体过剩越多，形成的 IC 量越少，这种现象称为前带现象。反之，若以定量抗体测定抗原时，当被测抗原浓度大于抗体的当量浓度后出现的 IC 量减少的情况，称为后带现象。当抗原与抗体的量比例合适时才出现明显的反应，而且这种反应最快，往往是在一系列不同比例的中间区域，此为等价带。总之，出现反应所需的抗原与抗体比例量基本是恒定的。

（四）反应的阶段性

抗原抗体反应过程一般可分为以下两个阶段。

1. 特异性结合阶段

此阶段是抗原决定簇与相应抗体 Ig Fab 段的高变区相互吸引而特异结合，反应速度较快，仅需几秒钟。

2. 反应的可见阶段

此阶段是在特异性结合的基础上，抗原-抗体复合物在环境因素（如电解质、pH 、温度、补体）的影响下，出现不同的反应现象：凝集、沉淀、补体结合、细胞溶解等反应。此阶段较长，历时数分钟、数小时乃至数天。

两个阶段难以严格区分，通常第一阶段反应还未完全完成，第二阶段反应已经开始，而且两阶段的反应所需时间亦受多种因素和反应条件的影响，若在开始时抗原抗体浓度足够且两者比较适合，则很快能形成可见反应。

三、抗原抗体反应的影响因素

抗原抗体反应的影响因素很多，除了抗原和抗体本身的性质、活性及浓度（或效价）等之外，还受到下列环境条件的影响。

（一）电解质

电解质是抗原抗体反应系统中不可缺少的成分，盐类中的 Na^{+}、Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 都是电解质，可中和抗原及抗体表面上的电荷而降低其电势。当抗原与抗体特异结合后，由亲水胶体变为疏水胶体。抗原与抗体的结合可不需要盐类帮助，但抗原抗体结合物的相互凝聚出现凝集反应或沉淀反应，以及补体参与出现溶解反应或补体结合反应，或者再加细胞黏附出现调理吞噬反应或免疫粘连反应等，均需有盐类存在。如有适当浓度的电解质存在，可促进二者相互凝聚，出现可见的沉淀或凝集现象。若无电解质存在，则不易出现可见反应。

一般用 0.85% NaCl 生理溶液作为抗原和抗体的稀释剂和反应溶液。但如果电解质的浓度过高（至 15%），反而妨碍抗原与抗体结合，并使抗原抗体凝集物或沉淀物离解，因此电解质围在抗原及抗体结合部位带有相反电荷的极性基上，以致降低抗原与抗体间相互吸引力。更高浓度的盐液（半饱和至饱和）可完全消除反应物上的电荷，即使单纯是抗原或抗体，也会发生非特异的沉淀，此称为盐析（salting），并非抗原抗体反应，常用于抗体的提纯。在补体参与的抗原抗体反应中，常在稀释液内添加适量的

Mg^{2+}和Ca^{2+}，以增强补体活性，这是因为补体具有酶的活性，需要这些阳离子盐类参与作用。

（二）酸碱度（pH）

适当pH是抗原抗体反应必要的条件之一，pH过高或过低都将影响抗原和抗体的理化性质。大多数抗原抗体反应的最适pH为6.0～8.0，抗体免疫球蛋白的等电点为pH4.8～6.6，溶血反应中的溶血素与红细胞抗原结合的最大限度在pH5.3（接近抗体的等电点），补体结合反应最合适的pH是6.3～7.8。不同的pH可影响反应物的电离及电荷性质，特别对抗体球蛋白的电离及带电性能影响较大，当pH为2.0～3.0时，形成的抗原-抗体复合物可发生解离。

（三）温度

合适的温度可加速抗原与抗体的结合和加快反应出现的速度。因抗体抗原的不同所需的合适温度也不同，一般是15～40℃为宜，最适温是37℃，也可高至50℃或低至4℃（如冷球蛋白或冷抗体）。在一定范围内，反应温度与反应速度有密切关系，温度高可使分子运动加速，增加抗体分子碰撞机会增多，二者的结合反应加速。但温度过高（56℃以上）反而使抗原-抗体复合物离解，又易破坏补体，60℃以上则造成抗体球蛋白变性及某些抗原破坏。

（四）振动和搅拌

振动与搅拌可以加速抗原抗体反应，增强反应物的相互碰撞和接触机会，因此可加速抗原抗体结合物的互相凝聚，但强烈的振荡也可使结合物离解。

（五）杂质

反应中如存在与反应无关的蛋白质、多糖等非特异性的结合物质，往往抑制反应进行甚至引起非特异性反应（沈关心和周汝麟，2002）。

第二节　经典的抗原抗体反应

抗原抗体反应是抗原与相应抗体之间所发生的特异性结合反应，可发生于体内（*in vivo*），也可发生于体外（*in vitro*）。体内反应可介导吞噬、溶菌、杀菌及中和毒素等作用；体外反应则根据抗原的物理性状、抗体的类型及参与反应的介质（如电解质、补体、固相载体等）不同，可出现凝集反应、沉淀反应、补体参与的反应及中和反应等各种不同的反应类型。因此，依据抗原抗体反应的现象及结果不同，将经典抗原抗体反应分为4大类：①颗粒性抗原与相应抗体结合所发生的凝集反应（agglutination）；②可溶性抗原与相应抗体结合所发生的沉淀反应（precipitation）；③抗原抗体结合后激活补体所致的补体结合反应（complement fixation reaction）和细胞溶解反应（cytolysis）；④细菌外毒素或病毒与相应抗体结合所致的中和反应（neutralization）。

一、凝集反应

颗粒性抗原（如细菌和红细胞等）与相应抗体相遇，在适量电解质存在的条件下，在比例适当时出现肉眼可见的凝集块，这种现象称为凝集反应。参与凝集反应的抗原称为凝集原，抗体称为凝集素。1896 年 Widal 利用此现象成功地诊断伤寒病；1900 年 Landsteiner 在此现象的基础上首次发现了人类 ABO 血型，并因此获得诺贝尔生理学或医学奖。目前，这些经典方法在现代科学中仍被沿用（Daurat et al.，2002）。根据凝集反应的原理、方法、使用材料及检测目的不同，凝集反应有以下类型（图 24-1）。



图 24-1　凝集反应的类型

（一）直接凝集反应

直接凝集反应是指颗粒型或细胞型抗原与相应的抗体在合适的环境相遇时，彼此即发生特异结合，再由抗原抗体结合物相互凝集成为肉眼可见的凝块。根据反应介质的不同分为玻片法和试管法两种。

1. 玻片凝集试验

玻片凝集试验是一种定性试验。通常是用已知的抗体作为诊断试剂诊断未知抗原。此法特异、简便、快速，常用于细菌的分型鉴定和检查人类红细胞 ABO 血型。

2. 试管凝集试验

试管凝集试验是一种半定量试验。常用已知的标准抗原作为诊断试剂，检测血清中特异性抗体及其含量。此法目前仍常用于某些病原微生物感染的免疫学诊断。例如，利用肥达氏反应（Widal test）检测患者伤寒杆菌的感染情况（Chart et al.，2000）；在输血时，也常用于受血者和供血者的交叉配合试验。此外，亦可用已知抗体鉴定未知的抗原，例如，用于钩端螺旋体血清型鉴定的显微镜凝集试验（过去称为钩端螺旋体凝集溶解试验）。

3. 玻片凝集试验检测伤寒沙门氏菌

伤寒沙门氏菌与伤寒沙门氏菌免疫血清在适当电解质环境中，发生特异性结合，形成抗原-抗体复合物，继而出现凝集现象。

材料与试剂

伤寒沙门氏菌免疫血清（1：10），灭活伤寒沙门氏菌液，生理盐水，载玻片，接种环

步骤

1）划区：取清洁载玻片一张，划分为实验区和对照区。

2）加免疫血清：用滴管在对照区和试验区分别滴加一滴生理盐水和伤寒沙门氏菌免疫血清。

3）加菌：接种环刮取伤寒沙门氏菌，分别至于实验区和对照区。

4）轻轻晃动。

5）结果观察：静止几分钟后出现乳白色凝集块者为阳性。

注意事项

1）接种环用之前必须用酒精灯灼烧灭菌。

2）接种伤寒沙门氏菌后尽力混匀，以防误将大的菌块作为阳性结果，但不要使实验区和对照区液体混合。

3）试验中由于电解质浓度和 pH 不适当等原因可引起非特异性凝集，出现假阳性，所以应设阴性对照管。

（二）间接凝集反应

间接凝集反应是指可溶性抗原（或抗体）吸附在惰性载体颗粒表面，使其成为致敏颗粒，然后与相应抗体（或抗原）结合，在电解质存在的条件下，载体颗粒被动地发生凝集，因此称为间接凝集反应。惰性载体颗粒主要有红细胞（绵羊红细胞或正常人 O 型红细胞）、活性炭粒、聚苯乙烯胶乳微粒等。根据试验时所用致敏载体颗粒不同分别称为间接血凝试验、炭粒凝集试验和胶乳凝集试验等。间接凝集反应的灵敏度比直接凝集反应高 2～8 倍，适用于抗体和各种可溶性抗原的检测，且微量、快速、操作简便、无需昂贵的实验设备及应用范围广泛。此外，间接血凝反应是检测抗体的敏感方法。例如，可用脑膜炎球菌、沙门氏菌的抗原成分、乙型肝炎表面抗原与红细胞结合以检测患者血清中相应的抗体。这是检测微量抗原（如毒素、细菌成分）和早期快速诊断传染病的敏感方法，现已用于诊断脑膜炎、布鲁斯氏菌病、出血热、病毒性肝炎等。此外，还可用于检测人和动物的组织抗原和激素抗原。

根据反应方式的不同，间接凝集反应包括以下几种方法。

1）一般（正向）间接凝集试验：以可溶性抗原致敏载体颗粒，检测标本中的相应抗体。

2）反向间接凝集试验：以抗体致敏载体颗粒，检测标本中的相应抗原。

3）间接凝集抑制试验：将待测抗原或抗体与相应的抗体或抗原先混合，待作用一定时间后，由于抗原与抗体存在对应性，即发生结合中和，当再加入相应的致敏载体颗粒，随后加入原本应出现的凝集现象受到抑制。

4）协同凝集试验（coagglutination，CoA）：金黄色葡萄球菌菌体细胞壁中所含的

A 蛋白（SPA）能特异性地与抗体 IgG 的 Fc 段结合（除 IgG3），成为一种吸附特异性抗体的金黄色葡萄球菌载体。当与相应的抗原接触时，通过标记在菌体表面的抗体 IgGF（ab′)$_2$ 段与抗原特异结合，从而使与抗原抗体反应无关的金葡菌发生凝集。

4. 反相间接血凝试验检测血清中甲胎蛋白

将可溶性的抗甲胎蛋白（AFP）的抗体吸附于绵羊红细胞（SRBC）上，形成 AFP 抗体致敏的 SRBC 颗粒，然后，再与相应抗原 AFP 结合，发生凝集现象（图 24-2）。

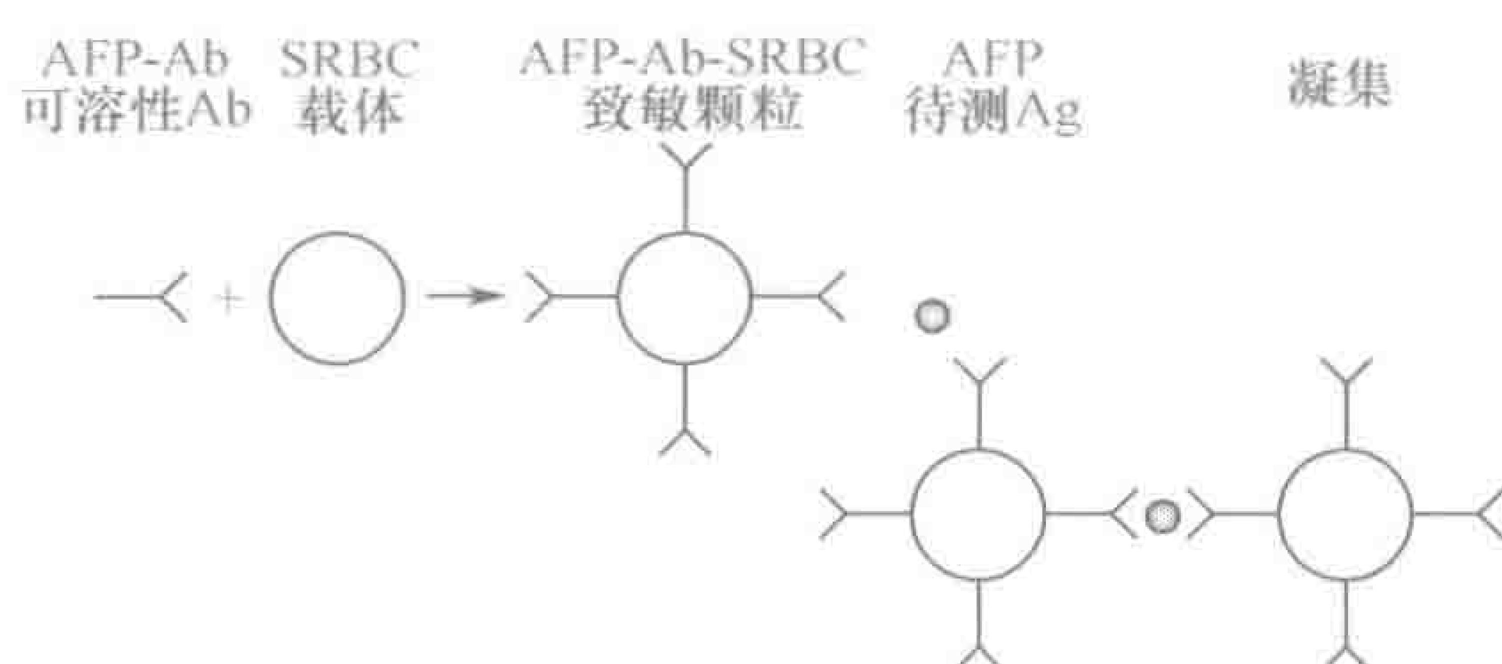


图 24-2　反相间接血凝试验的示意图

材料与试剂

冻干 AFP 诊断细胞（AFP 抗体致敏的 SRBC），稀释液（1%正常兔血清生理盐水），微量稀释棒，待测血清样品（阳性、阴性），37℃水浴箱，96 孔板，振荡器

步骤

1）加稀释液：96 孔板的 1、2 两排，1～6（即 A～F）孔用微量加样器每孔加 25μl。第 7（即 G）孔内，加盐水 25μl，作为阴性对照。

2）稀释抗原：用稀释棒 2 支，各蘸取阴性、阳性标本（约 25μl），分别插入 96 孔板的 1、2 两排的第 1（即 A）孔内，上下垛 3 次，左右搓 10 次，再上下垛 3 次。提出稀释棒移入第 2 孔，同样操作，进行倍比稀释，直至各排第 5 孔（即 E）。第 6（即 F）孔作为稀释液对照。

3）致敏红细胞：吸致敏红细胞悬液，用微量加样器每孔加 25μl。

4）振荡摇匀：将板置振荡器上振荡 1min，用烧灼的铅丝捅破孔内气泡后，加盖，37℃孵育 1h。

5）结果观察与分析。

观察结果时，先观察对照孔，再观察各个试验孔，观察凝集块大小，根据凝集块的大小和边缘的致密程度，进行如下记录：++++：细胞形成明显的凝集块，布满全孔，甚至出现卷边；+++：细胞形成薄层凝集，布满整个孔底；++：部分细胞沉到孔底，周围有薄层凝集，但面积小，边缘松散；+：细胞沉到孔底，呈圆扣状，周围有隐约可见的凝集；－：细胞沉到孔底，周围光滑整齐，呈紧密圆点状。记录结果，判定凝集效价。凝集效价指能发生++凝集现象试

管的最高稀释倍数。

注意事项

1）稀释棒用后插入75%乙醇消毒。

2）观察结果时要轻拿轻放，不要摇动，以免影响观察。

（三）Coombs 试验

是1945年由Coombs建立的一种抗球蛋白抗体参与的血凝试验，又称桥梁凝集反应，用于检测抗红细胞不完全抗体。不完全抗体主要是7S的IgG型抗体，其体积和长度较小，只能结合一方红细胞抗原，不能同时结合双方红细胞的抗原决定簇，因此不能发生凝集反应。此时，如在待测试的抗原和抗体（不完全抗体）之外，再加入抗该种抗体球蛋白的抗体，即可出现凝集现象。试验方法分为直接Coombs试验和间接Coombs试验两种。

1. 直接 Coombs 试验

用于检查已吸附在红细胞上的不完全抗体。此试验常用于新生儿溶血症、自身免疫性溶血症及特发性自身免疫性贫血等的检查。

2. 间接 Coombs 试验

用于检查血清中游离的不完全抗体。方法是将受检者血清与具有相应抗原特异性的红细胞悬液混合（例如，应用DCe/DcE型红细胞，可以检出与D、C、E、c和e抗原相应的抗体）。此试验多用于检测母体Bh（D）抗体，可以及早发现和避免新生儿溶血症的发生。亦可对红细胞抗原不相容性输血所产生的血型抗体进行检测。

二、沉淀反应

当可溶性抗原（如血清、毒素等）与相应的抗体在电解质存在合适的电解质环境中相遇，发生结合，当比例适当时即在清澄的溶液中出现肉眼可见的混浊沉淀物，称为沉淀反应。早在1897年，Kraus已发现鼠疫杆菌的培养滤液能与相应抗血清发生沉淀反应。至今仍然是一种常用的、简便可靠的免疫学试验方法。

根据试验中使用的介质和检测方法不同，沉淀反应可分为液体内沉淀反应和凝胶内沉淀反应两种类型（图24-3）。

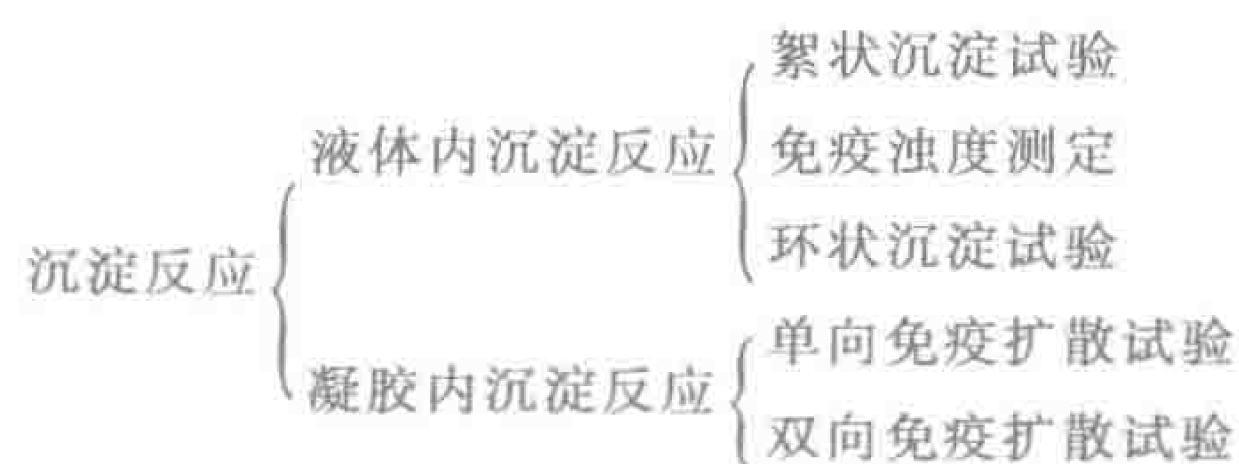


图24-3　沉淀反应的类型

因凝胶内沉淀反应操作比较简单、快捷，现主要介绍凝胶内沉淀反应。凝胶内沉淀反应是以适当浓度的琼脂（或琼脂糖）凝胶作为介质，利用可溶性抗原和抗体在凝胶中

扩散，形成浓度梯度，在抗原与抗体比例适当的位置出现可见的沉淀环或沉淀线。根据试验时抗原与抗体反应的方式和特性，分为单向免疫扩散试验、双向免疫扩散试验，以及与电泳技术结合的免疫电泳、对流免疫电泳和火箭电泳等（详见本章第三节）。

（一）单向免疫扩散试验

将一定量抗体于试验前混合进琼脂凝胶中，制成含抗体的琼脂板，然后与琼脂板上打孔，孔中加入一定量的待测抗原，使抗原单独在凝胶中扩散，因此称为单向免疫扩散试验或单向辐射状免疫扩散（single radial immunodiffusion，SRID）。在一定梯度范围内与抗体结合形成沉淀环，沉淀环的大小与抗原量呈正相关。当采用不同浓度的抗原与固定浓度的抗血清进行测定，以测得的沉淀环直径平方或面积作为纵坐标，抗原浓度作为横坐标，可绘制标准曲线（图 24-4）。待测抗原可在同样条件下测得沉淀环大小，然后从标准曲线上求得其含量。该方法操作简便，但影响因素较多，对于标准曲线的绘制方法还存在着不同意见。

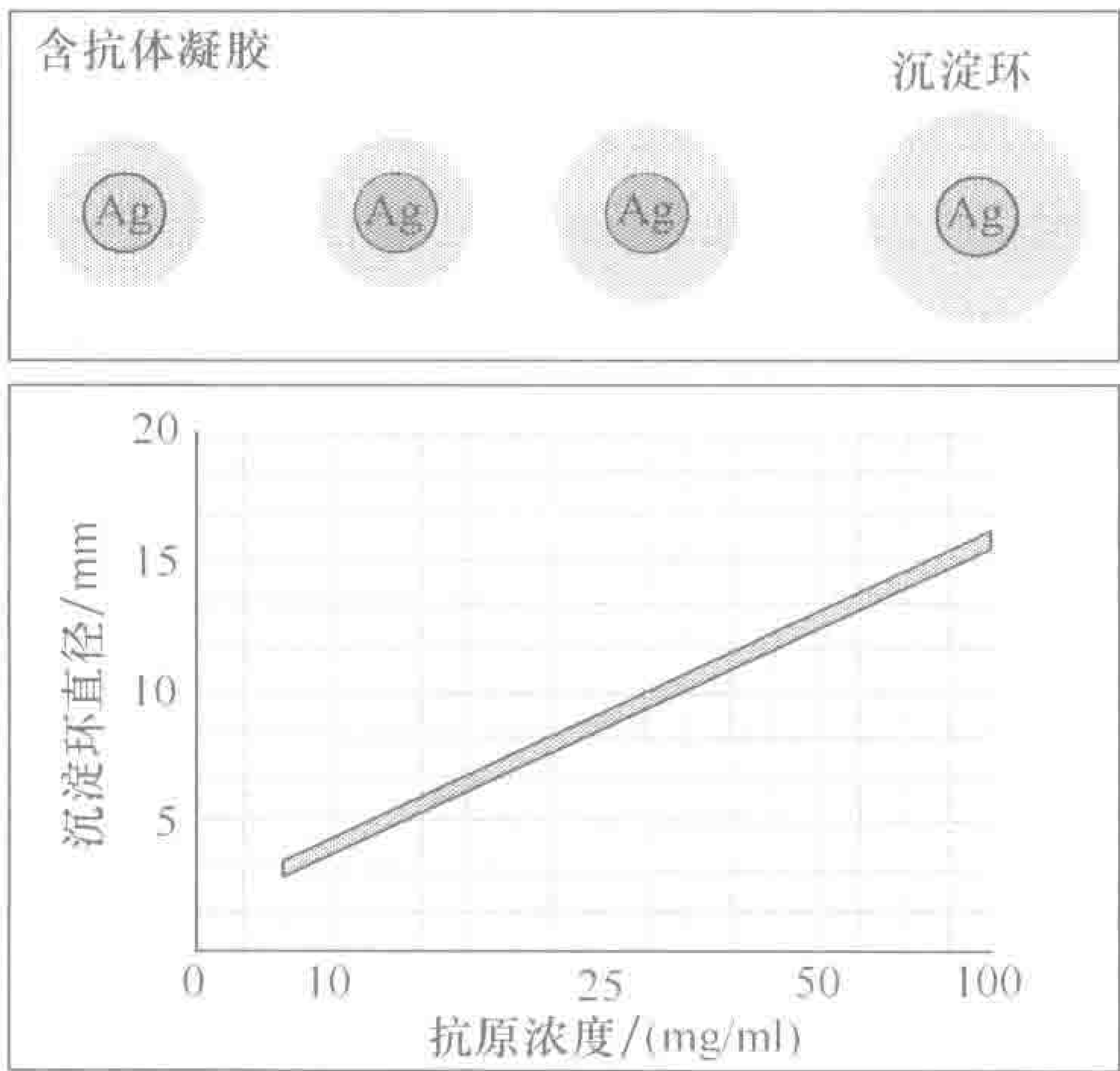


图 24-4　单向免疫扩散试验结果示意图

单向免疫扩散检测人血清中 IgG 含量

材料与试剂

3%琼脂，标准参考血清，IgG 诊断血清，待检人血清，打孔器，微量加样器，塑料板，湿盒

步骤

1）制备含抗体的琼脂板。

2）稀释参考血清和待检血清：将干燥参考血清中加入 0.5ml 蒸馏水，完全溶解后用 PBS 稀释成不同的稀释度，将待检血清用 PBS 稀释成 1∶40。

3）用打孔器按照打孔模式图在琼板上打孔，用注射器针头挑出孔中琼脂。

4）加样完毕后将琼脂板置于湿盒，37℃ 24h 观察结果。

5）结果观察和分析：取出琼脂板，可见孔周围乳白色沉淀环，绘制标准曲线。量取待测血清孔的沉淀环直径，从标准曲线上查出相应的 IgG 含量，再乘以待测血清稀释倍数，即为待测血清 IgG 含量。

注意事项

待检标本抗原蛋白含量应不低于 1.25μg。

（二）双向免疫扩散试验

在琼脂上打多个孔，分别加入抗原和抗体，二者同时相互扩散，在比例适合处特异性结合形成沉淀线。观察沉淀线的位置、数量、形状，以及对比关系，可对抗原或抗体进行定性分析，常用于抗原和抗体的纯度鉴定。此法亦可用于免疫血清抗体效价测定。该试验自 Ouchterlony、Klek 及 Oakley 相继建立以来，方法不断改进，主要有平皿法和玻片法两种，后者较为简便，也易于观察，应用最广。

双向免疫扩散试验有下列几方面的应用：①用已知抗血清（或抗原）检查未知抗原（或抗体）。如用特异性抗血清检测患者血清中乙型肝炎抗原，又如用已知可溶性抗原检查某些真菌病、寄生虫病、自身免疫性疾病等患者血清中的抗体。本方法的缺点是所需时间长，灵敏度不很高，因此目前多被快速、灵敏的对流免疫电泳或其他免疫测定方法所替代。②用已知抗体分析和鉴定抗原成分。③检查抗血清或抗原的纯度。④半定量滴定抗血清的效价。⑤与琼脂电泳相结合（免疫电泳）用于详细分析血清蛋白的组成及某一血清蛋白成分纯度的鉴定。

采用此种方法，El Amiri 等（2003）利用特异性抗体检测胎盘萃取物中的抗原，以鉴定物种。我们也常利用此种方法检测抗体的效价。

在测定未知抗原和抗体和检查纯度时，应选用 2 个孔的模式；在比较两种抗原异同时，可选用 3 个孔的模式，而在半定量滴定抗血清效价时，则选梅花样多孔模式（图 24-5）。



图 24-5　双向免疫扩散试验孔形图

双向免疫扩散检测抗体的效价

材料与试剂

1.2 %琼脂生理盐水，载玻片，试管，吸管，生理盐水，毛细滴管，打孔器，抗原，抗体，图形卡，挑针，湿盒

步骤

1）制板：用吸管吸取热琼脂 3.5ml，铺于载玻片上，琼脂厚度约为 2.5mm。

2）打孔：待琼脂凝固后，按照图形卡（图 24-6）用打孔器打孔（梅花形），用针挑去孔内琼脂，将玻片或平皿底部在酒精灯焰上略微加热，或在小孔内加入少量熔化的琼脂封底。

3）加样：在中心孔内加抗原，周围各孔内顺序加入倍比稀释的免疫血清，经过扩散后，以出现沉淀线的血清最高稀释度为其抗体效价。

4）扩散：琼脂板置于湿盒中，37℃ 18h 观察结果。

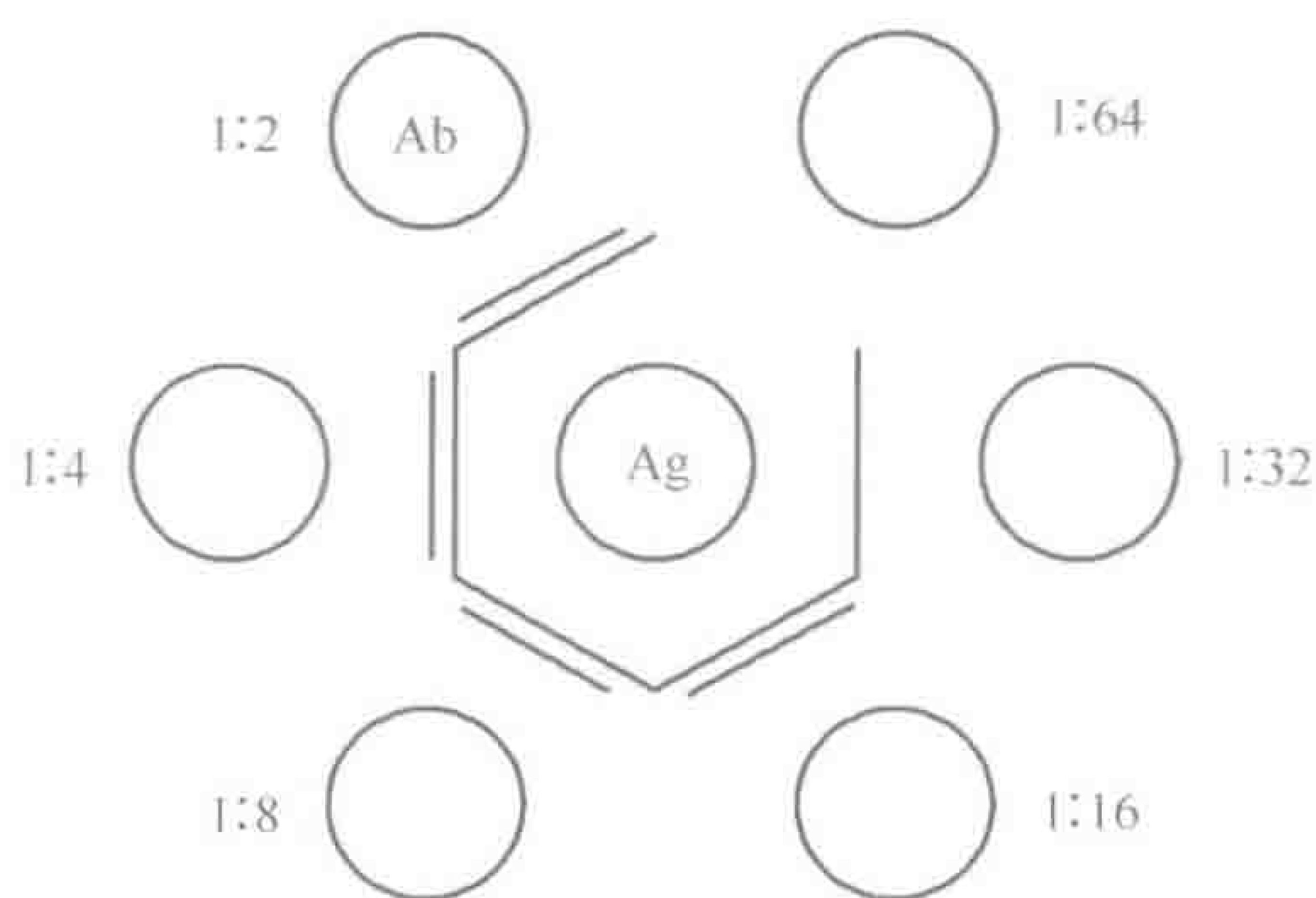


图 24-6 定量试验（梅花孔）

5）结果观察和分析：抗原以出现沉淀线的血清最高稀释度为其抗体效价。

根据沉淀线的有无和形式可初步定量和分辨抗原成分及抗体种类。在相对应的抗原和抗体之间只形成一条沉淀线，两种不同的抗原和抗体之间则形成交叉的沉淀线（图 24-7）。

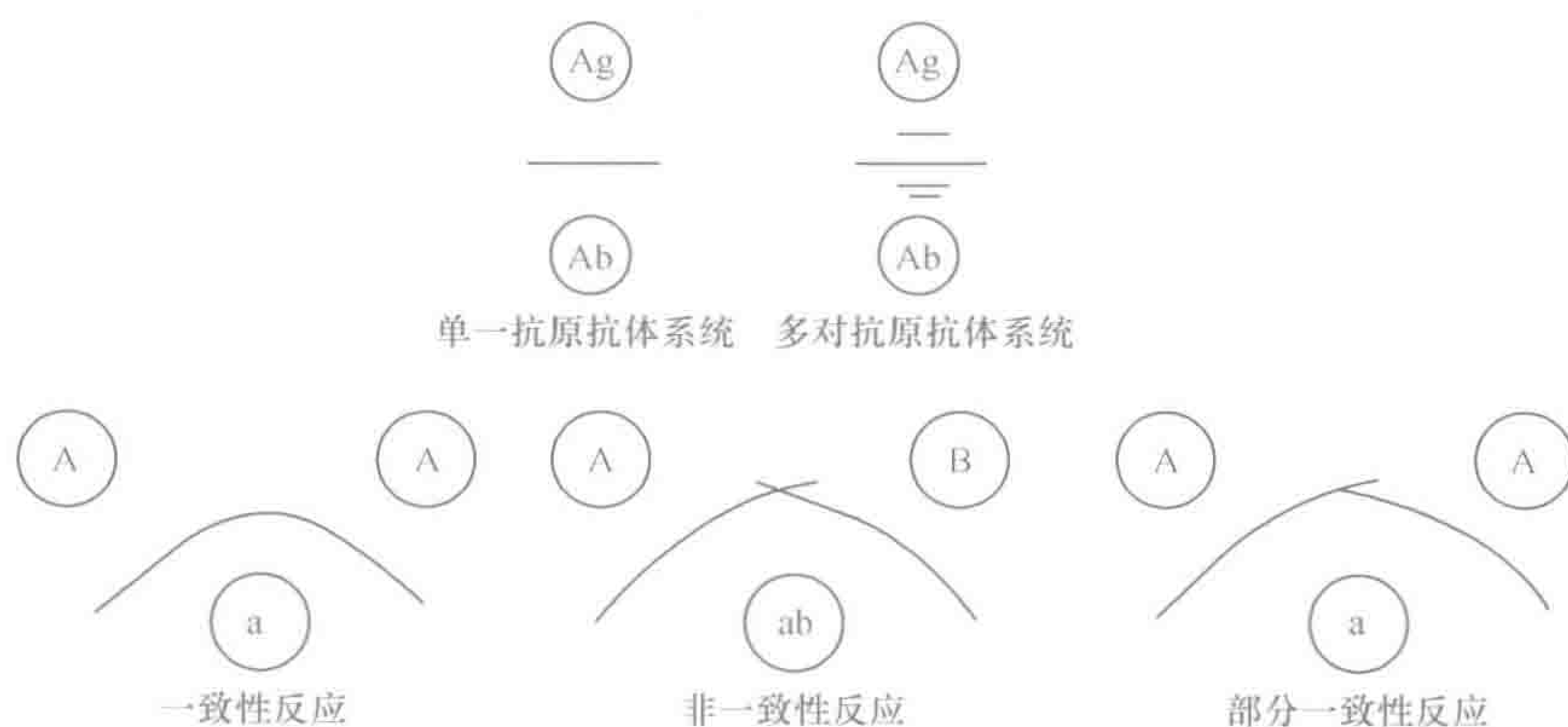


图 24-7 沉淀线形状与抗原/抗体性质的关系

下面是常见沉淀线及结果判定：一对相应的抗原、抗体，沉淀线在两孔之间，呈直线；两种抗原（A）相同，与抗体（a）之间形成沉淀线末端可相互连接，形成沉淀弧；两种抗原完全不同，形成的沉淀线互不干扰，交叉而过；两种抗原部分相同，则沉淀线既相互连接，又多出一个小刺。

注意事项

1）制板时将琼脂均匀地浇注于玻片，注意勿产生气泡。

2）将玻片或平皿底部在酒精灯焰上略微加热，以防过热引起小孔变形。

三、补体参与的试验

补体是存在于正常人或动物新鲜血清中一组具有酶活性的球蛋白，其活性不稳定，不耐热，56℃ 30min 即被灭活。参与杀菌、溶解靶细胞免疫调节，是机体非特异性免

疫应答中的重要部分。补体可非特异性的与大多数抗原-抗体复合物结合而被激活，从而产生溶解细胞效应，据此特性补体结合试验可用来检测未知抗原或抗体。体外试验中，补体参与多种抗原抗体反应，主要有溶血试验、补体结合试验、免疫黏附试验及溶血空斑试验等。现分别介绍如下。

（一）溶血试验

将抗红细胞的抗体（通称溶血素）与相应的红细胞混合，当有补体存在时，红细胞即被溶解，产生溶血现象，称为溶血反应。由于此种特异性溶血现象肉眼可见，广泛用于血清总补体活性测定及补体中各亚成分（如C4、B因子等）功能活性的检测（详见第八章补体测定技术）。此外，溶血试验常用于补体结合试验中作为指示系统。

溶血试验观测补体介导的溶血现象

材料与试剂

2%绵羊红细胞悬液（SRBC），补体，抗绵羊红细胞抗体（溶血素），生理盐水，试管，刻度吸管，37℃水浴箱，离心机

步骤

1）取三支试管，按下表加入各种试剂。

序号	1	2	3
2%绵羊红细胞悬液	0.3ml	0.3ml	0.3ml
溶血素	0.3ml	0.3ml	—
补体	0.3ml	—	0.5ml
生理盐水	0.3ml	0.6ml	0.6ml

2）将试管放置37℃水浴箱15～30min，观察有无溶血现象。若红细胞溶解，则混浊液体变为红色透明液体。

3）将不溶血的第2、3试管，低速1000r/min离心3～5min。用毛细滴管将第2管上清放入第4管，第3管放入第5管，按下表加入各种试剂，将试管放置37℃水浴箱15～30min，观察记录结果。

管号	2	3	4	5
内容物	沉淀物	沉淀物	管2上清	管3上清
2%绵羊红细胞悬液	—	—	0.3ml	0.3ml
溶血素	—	0.3ml	—	0.3ml
补体	0.3ml	—	0.3ml	—
生理盐水	1.5ml	1.5ml	—	—

注："—"代表无。

注意事项

1）补体必须新鲜。

2）试剂及器材要洁净。

（二）补体结合试验

补体结合试验（complement fixation test，CFT）是经典的抗原抗体反应之一。其原理是依据补体能与各种抗原-抗体复合物结合，但当抗原与抗体不相对应时，补体则不被结合而游离存在。如在上述反应系统中，加入绵羊红细胞（抗原）和溶血素（抗体），即可与游离的补体结合发生溶血反应。因此，绵羊红细胞和溶血素是补体结合试验中的指示系统（亦称溶血系统）。根据溶血现象是否产生，即可知待检系统中有无相应的抗原或抗体存在（详见第八章）。这一方法广泛应用于传染性疾病的诊断和流行病学调查，自身抗体和肿瘤相关抗原的检测。

（三）免疫黏附试验

补体系统被激活后，可产生一系列具有生物学活性的重要片段。这些片段通过与表达于细胞表面的相应受体结合而发挥作用。其中 C3b/C4b 与 CRI 和 CR3 的结合被称为免疫黏附，可增强吞噬的调理作用和清除免疫复合物。根据免疫黏附作用原理，在体外试验中设计和建立了多种免疫学检测方法，现介绍如下。

1. Raji 细胞试验

Raji 细胞是从 Burkitt 淋巴瘤患者血细胞中分离的一种 B 细胞株，表面有大量 C1q、C3b 和 C3d 受体，但无表面免疫球蛋白，因此能与带有补体的免疫复合物结合。具体方法：先在塑料管中加入一定量的 Raji 细胞，再加入待检血清，充分作用后离心洗涤；最后加入荧光素标记的抗人 IgG，洗涤后细胞表面显现荧光为试验阳性；但荧光法只能做定性检测。或加入同位素标记的抗人 IgG，离心洗涤后检测沉淀细胞的放射活性；以热聚合 IgG 作参考标准，可绘制出 CIC 含量与放射活性的标准曲线，从而求得待测标本中 CIC 的含量可用间接免疫荧光法或放射免疫法进行检测。

Raji 细胞法敏感性高、特异性强、方法简单、不受 DNA 与内毒素的影响；但 Raji 细胞表面还有 Fc 受体，因此被检血清中的游离 IgG 通过 Fc 段与 Raji 细胞结合，造成假阳性。在待检标本中有抗淋巴细胞抗体时也可导致假阳性。再则，维持 Raji 细胞的培养较困难，培养条件的变化可改变 Raji 细胞表面受体的数目及亲和性，影响检测敏感性。

2. 免疫黏附血凝试验（IAHA）

IAHA 是利用抗原-抗体复合物能激活补体，当加入具有补体受体（CRI）的细胞（常为 O 型人红细胞）后，免疫复合物中的 C3b 与红细胞表面的 CRI 发生免疫黏附出现凝集现象。此法是测定各种抗原、抗体或补体含量的高度灵敏方法之一。可用于检测 10ng/ml 以下 HBsAg。此法操作简单，不需溶血素，亦不需要滴定补体，且不受抗补体作用的影响。

（四）溶血空斑试验

溶血空斑试验又称空斑形成细胞（plaque forming cell，PFC）测定是一种体外检

测 B 淋巴细胞产生和分泌抗体功能的试验方法。将一定量洗涤过的绵羊红细胞（SR-BC）免疫小鼠，4～5d 后将小鼠处死，取脾脏制成细胞悬液，内含抗体形成 B 淋巴细胞。然后将脾细胞和绵羊红细胞混合，在加补体参与下，SRBC 溶解，从而在每个分泌抗体的 B 淋巴细胞周围形成一个透明的肉眼可见的溶血空斑。此方法所检测的是分泌具有高溶血效应的 IgM 的 PFC，可作为机体免疫状态的指标，用以研究药物对机体免疫功能的影响等特异指标，具有特异性高、筛检力强、可直接观察等特点（试验方法详见第八章）。

四、中和试验

中和试验是免疫学和病毒学中常用的一种抗原抗体反应的试验方法，病毒或毒素与相应的抗体结合，抗体中和了病毒或毒素，失去了其生物学效应，这种试验称为中和试验。这种使其失去感染力的抗体称为中和抗体；能与细菌外毒素结合，中和毒性作用的抗体称为抗毒素。此试验可在动物、鸡胚或组织培养中进行。根据其应用分为以下 3 种类型。

（一）毒素中和试验

检定外毒素或抗毒素的技术。通常将一定量的一方（如外毒素）与递增稀释度的另一方（如抗毒素）混合，接种于适当的动物体，然后观察动物的死亡情况。如果毒素过多，可以引起特殊的症状与死亡。如果抗毒素过量，动物则不发生任何可见的反应。以半数动物的存活情况定出中和指数。

（二）病毒中和试验

用于检查患过某些病毒疾病或免疫机体血清中抗体的增长情况的方法。也可用于鉴定病毒和研究抗原结构。一般用不同稀释度血清与定量病毒等量混合，放置一定时间，然后接种到细胞培养管中，每天观察细胞病变，以能抑制细胞病变的血清最高稀释度作为终点效价。这一试验多采用细胞培养，比动物和鸡胚试验经济而方便。中和抗体特异性高，维持时间较长，是流行病学调查常用的方法。

（三）抗链球菌溶血素“O”试验

也属于中和试验的一种。有的细菌能产生溶解红细胞的毒素，如乙型溶血性链球菌能产生溶解人或兔红细胞的链球菌溶血素“O”。因其抗原性强，能刺激机体产生相应抗体，当该毒素遇到相应抗体时，则被中和而不出现溶血。目前临床诊断风湿病所用的抗“O”试验，就是用以测定患者血清中链球菌溶血素“O”抗体的中和试验。如果这种抗体在患者血清中高于正常值，即表明患者不久前或目前有溶血性链球菌感染。

第三节　免疫电泳技术

免疫电泳是 Grabar 与 Williams 于 1953 年创立的一种免疫学实验方法，主要是将

琼脂内电泳和双相免疫扩散两种方法结合的实验方法。随着人们实验的需求及实验技术的发展，在经典免疫电泳技术上，又衍生出对流免疫电泳、火箭电泳、交叉电泳、荧光免疫技术等多种技术和方法。现分别简要介绍如下。

一、免疫电泳

免疫电泳是琼脂平板电泳和双相免疫扩散两种方法的结合。先将抗原样品在琼脂平板上电泳，各种成分因电泳迁移率的不同而彼此分开，再加入抗体进行双相免疫扩散，当分离的抗原成分与特异性抗体在琼脂中扩散而相遇，在二者比例适当的地方，形成肉眼可见的沉淀弧（图 24-8）。

此方法可用于抗原和抗体的相对应性的测定、样品的各成分以及它们的电泳迁移率的测定、复合物中某种蛋白质的存在、鉴定抗原或抗体的纯度。

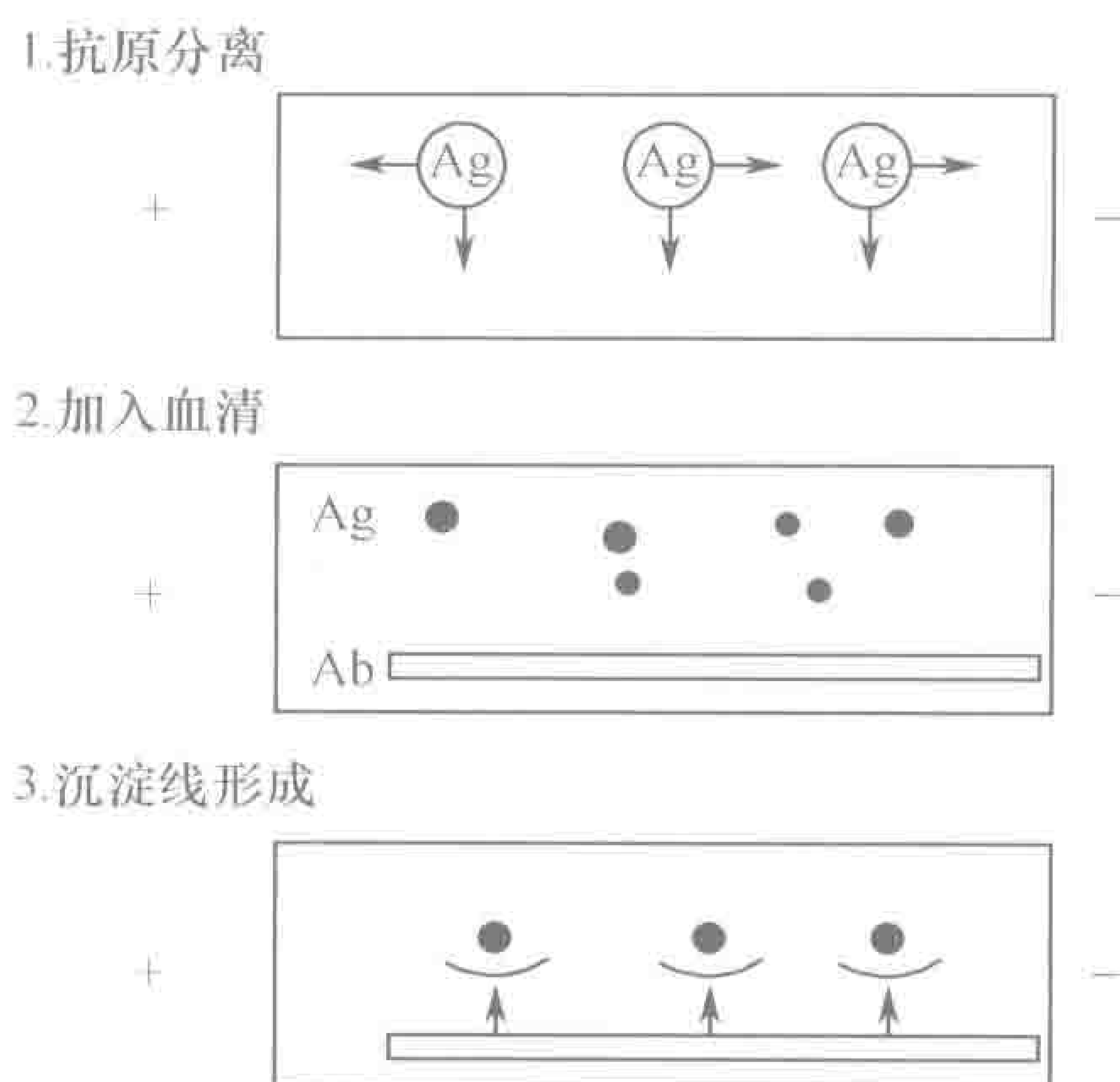


图 24-8　免疫电泳原理示意图

免疫电泳检测抗原和抗体的相对应性

材料与试剂

抗原，抗血清样品，电泳仪和平板电泳槽

pH 8.6，0.05mmol/L 巴比妥钠缓冲液：二乙基巴比妥酸 1.84g，二乙基巴比妥酸 10.30g，蒸馏水溶解至 1000ml

离子琼脂凝胶

玻璃板，打孔器等

氨基黑染色液：0.05%氨基黑 10B（amido black 10B），脱色液（1mol/L 冰乙酸）

步骤

1）制板：取洁净的载玻片或玻璃板，将预热 1% 离子琼脂胶倒入板中，板厚为 1.5～2.0mm，放置凝固。

2）打孔：打孔器打孔，直径 3～6mm。

3）加样：在孔内加满抗原。

4）将载玻片置电泳槽上进行电泳。电流为 2～3mA/cm（或电压 3～6V/cm），电泳时间 1～2h。

5）停止电泳，取出琼脂板，在与电泳平行方向、距样品 4～5cm 处切割电泳槽。用小刀片在琼脂板两侧切开，加抗血清样品。

6）于湿盒内 37℃（或常温）扩散 24h，取出。

7）于生理盐水中浸泡 24h，期间换液 3～5 次，取出后，氨基黑染色 5～10min，之后用冰乙酸脱色至无色为止。

8）结果观察和分析：在黑色背景上用斜射光直接观察结果或置于特制的照明观察

箱上进行观察并照相记录。

由于抗原在琼脂中呈放射状扩散，而对应的抗体呈直线扩散，因此生成的沉淀线一般呈弧形，常见的弧形如下。

(1) 交叉弧：表示抗原成分的迁移率相近，抗原性不同。

(2) 平行弧：表示两个不同的抗原成分，它们的迁移率相同，但扩散率不同。

(3) 抗原、抗体的过量还会出现加宽弧和分枝弧。

注意事项

1) 抗原抗体比例适当。抗血清多来源于兔、羊、马。兔抗体的特点是与抗原形成宽而淡的沉淀线，如抗体过量对沉淀线影响较小，但抗原过量，沉淀线则会发生部分溶解。马抗血清所形成的沉淀线致密、清晰，抗原或抗体过量时，形成的复合物沉淀溶解、消失，还会产生非特异性沉淀。

2) 抗原抗体的特异性程度。沉淀线的清晰度与抗原抗体的特异性程度有关。如抗体效价较低，需要适当考虑抗原孔径的大小和抗体槽的距离。

3) 抗原的抗原性和抗体的反应性。无抗原性的物质或抗原性差的抗原、非沉淀反应性抗体，均不能用免疫电泳进行分析。

二、对流免疫电泳

对流免疫电泳（counterimmunoelectrophoresis，CIEP）是将双向免疫扩散与电泳相结合的一种技术。在 pH8.6 的琼脂电泳中，大部分蛋白质抗原带负电荷向正极移动；而抗体大部分属于 IgG 移向负极，这是因为 IgG 分子质量大，且暴露的极性基团较少，在离子琼脂中泳动缓慢，同时受电渗作用的影响向负极泳动。两者相遇在比例适当处形成乳白色沉淀线。由于电场的作用，抗原、抗体的自由扩散受到限制，定向泳动，增加了试验的敏感性，并缩短了反应。本法快速、操作简单。CIEP 可应用于一些感染性疾病的快速诊断，如流行性脑脊髓膜炎等（Mansueto et al.，1980）。

CIEP 检测患者乙肝表面抗原（HBsAg）

材料与试剂

待测样本，阳性样本，HBsAg 抗体

其他同免疫电泳

步骤

1) 制琼脂板和打孔：同免疫电泳方法配制琼脂凝胶板，厚度 2～3mm。按图 24-9 所示打孔，孔径 3mm，孔距 4～5mm。挑去孔内琼脂，封底。

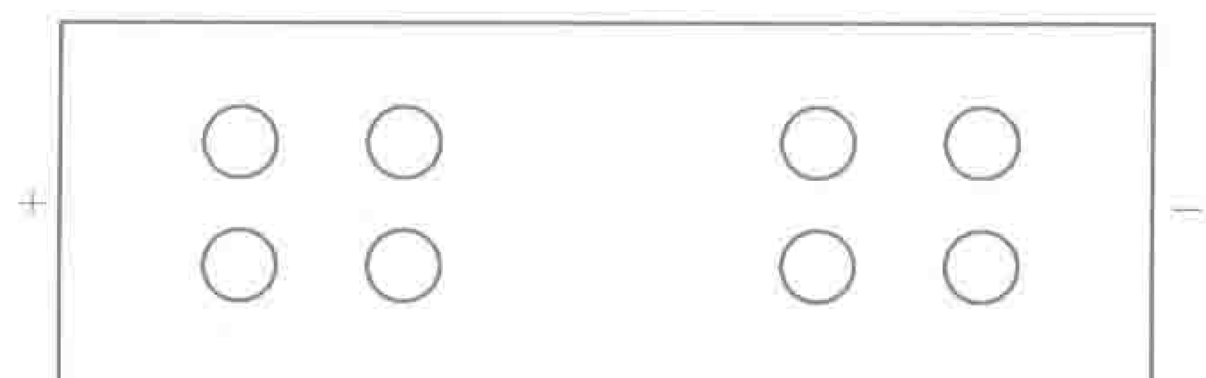


图 24-9　打孔示意图

2）加样：一对孔中，在靠近负极的孔中加入待检样本，正极端孔中加入 HBsAg 抗体，以注满小孔为限，实验同时设阳性及阴性对照。

3）电泳：按琼脂板长度电压 4～6V/cm，或电流 2～4mA/cm，电泳 45～60min 后观察结果。5mA/cm，电泳时间 60～90min。

4）在黑色背景上，透过散射光线观察。两孔之间出现乳白色沉淀线的为阳性，无沉淀线为阴性。HBsAg 阳性对照应有明显的沉淀线。如沉淀线不清晰，可将琼脂板置 37℃湿盒中，放置数小时后再观察。

注意事项

1）抗原抗体浓度的比例适当：只有当抗原抗体比例适合时，才出现明显可见的沉淀线。因此，每份待测样品均可做几个不同的稀释度来进行检查。

2）特异性对照鉴定：在待检抗原孔的邻近并列孔中加入一阳性抗体，若待检样品中的抗原与抗体所形成的沉淀线和阳性抗原抗体沉淀线完全融合时，则待检样品中所含的抗原为特异性抗原。

3）适当的电渗：琼脂质量差，电渗作用太大，造成非特异性反应。电渗太小，易造成假阴性。

三、火箭免疫电泳

火箭免疫电泳（rocket-immunoelectrophoresis，RIEP）是一种单向免疫扩散和电泳相结合的定量检测方法。抗原在含有抗体的琼脂凝胶中进行电泳，在电场作用下，抗原向正极方向移动，在移动的过程中，逐步与凝胶中的抗体结合，在比例适当处形成一个状如火箭的不溶性免疫复合物沉淀峰。沉淀峰面积与样品中的抗原浓度呈正相关，因此可用于抗原的定量测定。反之，当琼脂中抗原浓度固定时，便可测定待检抗体的含量（即反向火箭免疫电泳）。此法具有敏感性高、快速等优点。

RIEP 可定量检测血清中某一蛋白含量（如 AFP、IgG、C3 及外分泌液中 sigA 的含量等）及测定粪便悬液中 α1-抗胰蛋白酶，诊断蛋白质丢失性肠病等（Harriet et al.，1984）。

RIEP 检测甲胎蛋白 AFP

材料与试剂

0.05mol/L pH8.6 巴比妥缓冲液配成 2%的琼脂
待检抗原样品
标准阳性抗原和抗 AFP 抗体
其他材料同免疫电泳

步骤

1）制板：配制 2%琼脂煮沸溶化后，放入 60℃水浴箱中。

2）抗体稀释：将适量的抗 AFP 抗体用 0.05mol/L pH8.6 巴比妥缓冲液稀释至琼脂同样的体积量，放入 60℃水浴。

3）将两者充分混合，立即倒成平板。

4）打孔和加样。在琼脂板的负极端一侧打一排孔，孔径 3mm，孔距 6mm。于孔内分别加入不同浓度的标准抗原和受检样本。

5）电泳：电流强度 3mA/cm（或电压 10V/cm），电泳时间 2～10h。时间根据样品抗原含量和抗体浓度而定。一般泳动距离为 2～5cm。

6）停止电泳，将琼脂板于生理盐水中浸泡 24h，期间换液数次。

7）电泳毕，关闭电源，取出琼脂板，浸泡于 1%鞣酸生理盐水溶液中。

8）标准曲线的绘制：测定不同浓度抗原形成的沉淀峰的高度（或面积），然后以抗原量为纵坐标，沉淀峰高度（或面积）为横坐标，制成标准曲线。

9）测其待测抗原所形成的沉淀峰的高度（或面积），然后从标准曲线中查出 AFP 相应的含量。

注意事项

1）抗原抗体的用量：抗原与抗体以不同浓度梯度进行方阵试验，轮廓清晰，前端尖窄而闭合的抗体最小量作为抗体的最适用量，峰的合适高度为 2～5cm。

2）对照组的设置：在测未知抗原的同时，必须设置已知标准抗原作为电泳对照。

3）电泳时间：要根据峰的形成情况而定。如呈钝圆形，前面有云雾状，可将样品适当稀释。

四、交叉电泳

交叉免疫电泳（crossed immunoelectrophoresis，CIFP）是一种琼脂平板电泳和火箭电泳结合起来的方法。首先抗原样品依据不同的迁移率在琼脂凝胶中进行电泳分离，然后在与原泳动方向呈垂直的方向泳向含抗体的琼脂凝胶中，于是相对应的抗原抗体依次形成若干锥形沉淀线，根据沉淀线的位置及面积（或高度）可确定该抗原的质和量。此法具有分辨力更高，且有利于各蛋白质组分的比较，既能用于定性分析，也可用于定量测定。CIFP 可用于正常人和各种患者血清中蛋白质的定量检测及研究各种蛋白质变化的相互关系，此外，也可以鉴定抗体及其滴度 。

交叉免疫电泳检测抗原的含量

材料与试剂

待检抗原和多价特异性抗血清

其余同前述免疫电泳

步骤

1）取 10cm×10cm 的洁净玻板，先用少许 1%无盐琼脂铺底，加 1%溶化琼脂糖 10ml，均匀浇注玻板、冷凝。

2）打孔，在距负极端 2cm，玻板边 2.2cm 处，用 0.8cm×0.2cm 打孔器打孔。

3）将抗原加入孔内，电泳。电压 10V/cm，泳动 1h。如在样品中加入少许溴酚蓝，可随时观察样品蛋白质泳动的距离。

4）电泳结束后，切除非抗原电泳部分的琼脂（约 6cm×10cm）。

5）重新浇注含一定量抗体的琼脂糖 8ml，铺入切去的琼脂部分，使与原先的琼脂

糖凝胶板完全融合，冷却。

6）将玻板与原电泳方向垂直放置，使泳动后的抗原凝胶置于负极，电泳。电压为3V/cm，泳动6～20h。

7）漂洗、染色、脱色、烘干。

8）结果观察和分析：与标准抗原抗体锥形沉淀线比较，判定和分析结果。

注意事项

1）抗原抗体的最适稀释度必须事先摸索好。如抗体太浓，可使沉淀峰过低；而抗原太浓，则在一定时间内不能获得最高沉淀峰，甚至成弥散状无法测量。一般沉淀峰高度以2～5cm为最好。

2）第二次电泳时间的长短以观察锥形沉淀线的出现为准。电泳时间长短不一，短时2h即可出现。

五、放射免疫对流电泳

放射性元素标记的抗体（或抗原）在含有抗原（或相对应抗体）发生沉淀时，沉淀线通过自显影显现此种方法能检出肉眼看不见的沉淀线，从而提高反应的敏感性，这种方法可应用于凝胶中的所有反应。此方法是一种快速、敏感、简易的免疫测定方法。

放射免疫对流电泳检测患者血清中癌胚抗原（CEA）

材料与试剂

放射性同位素^{125}I标记的CEA抗体，待检样品，X射线胶片或全色胶片，显影液与定影液

其他同对流免疫电泳

步骤

1）打孔：按对流免疫电泳制备凝胶板并打孔。

2）加样：负极端孔内加CEA抗原，正极端孔内同位素标记的CEA抗体。在加被检抗原样品时，迅速加入标记抗体，并使之混合，勿使抗体吸收后再加标记抗体，以免由于标记抗体的滞留而形成假阳性。

3）电泳：电流2.6cm×7.5cm的小板用4mA。

4）电泳后，平板浸在3%HCl中漂洗8h，换液2次。

5）用流水漂洗过夜。

6）干燥：室温或鼓风机吹干。

7）曝光：在暗室将胶片切成与平板一样大小，然后将药面密接凝胶面，再在胶片上压一张玻板，用黑布包严，皮筋扎紧，24h，将底片放入显影液15min，最后自来水冲洗30min，晒干。

8）结果判定：在抗原抗体孔之间形成一条清晰的黑色影像者，判为CEA阳性。

注意事项

1）注意同位素防护和污染。

2）CEA 假阳性现象：有些肠道肿瘤患者血清中含有高浓度的 CEA，在琼脂糖中与抗体结合过程中，抗原-抗体平衡点已离开琼脂糖平板，致使受检血清处呈现空白区，无放射性标记物的痕迹。这种现象主要因为抗原含量浓度过高，为防止这种现象的出现，在试验时对抗原进行多次倍比稀释。

第四节　免疫微粒技术

免疫微粒技术是利用高分子材料合成一定粒度大小的固相微粒作为载体，包被上具有特异性亲和力的各种免疫活性物质（抗原或抗体），使其成为免疫致敏微粒，用于免疫学及其他生物学检测与分离的一项技术。作为载体的微粒通常是以某种高分子有机单体为原料，经过乳液聚合、悬浮聚合及辐照聚合等高分子聚合方法制备而成。由于制备材料及工艺不同，微粒的种类繁多，现已制成惰性微粒（如聚苯乙烯胶乳微粒）、活性微粒（如羧化聚苯乙烯微粒）、磁性微粒及标记微粒（用同位素、荧光素或酶标记）4 大类微粒，数量多达几十种。将制备好的微粒与抗原（或抗体）经物理吸附、化学偶联及桥联亲和素-生物素法等致敏方法形成免疫微粒。广泛应用于各种可溶性大分子物质的检测、分离与纯化、细胞标记与识别等。近年来，微粒技术在核酸分子杂交、DNA 与 RNA 的分离及 PCR 等研究领域亦显示出广阔的应用前景（兰小鹏，1994）。

一、胶乳微粒免疫检测技术

将特异性致敏的胶乳微粒（一般为直径约 1μm 的聚苯乙烯胶乳）与待测标本中相应抗原相遇，发生凝集反应，胶乳凝集程度与待测标本中抗原浓度呈函数关系，由此可测出标本中待测物的含量。此法是一种非放射性均相免疫测定法，测定方法主要包括粒子计数法和浊度法两种。

（一）胶乳凝集试验

胶乳凝集试验也是一种间接凝集试验，将可溶性抗原（或抗体）致敏胶乳微粒，制成的免疫胶乳（immunolatex）与相对应的抗体（或抗原）结合，发生特异性凝集反应。临床上主要应用于妊娠诊断、抗链球菌溶血素、类风湿因子（RF）、C 反应蛋白（cRP）等检测，由于此法具有操作简单，反应迅速等特点，所以广泛用于某些疾病诊断过程中过筛试验。常用于早期妊娠的快速诊断和绒癌的疗效监测。当 HCG 致敏胶乳与抗 HCG 血清相遇，二者即发生结合而出现凝集；而在妊娠（或绒癌）时，尿液中 HCG 含量增多，竞争与抗 HCG 血清结合，从而抑制 HCG 致敏胶乳凝集。

胶乳凝集试验测定血清中促绒毛膜性腺激素（HCG）

材料与试剂

家兔抗 HCG 血清，HCG 致敏胶乳，待测尿液标本

步骤

1）取家兔新鲜尿液，在黑色背景的玻片上滴加待测尿液和抗 HCG 血清各一滴

混匀。

2）加入 HCG 致敏胶乳一滴，摇动混匀 2～3min。

3）结果观察和分析：肉眼观察出现明显凝集现象者为阴性；未出现凝集，保持均一的乳浊状者为阳性；必要时可将尿液标本做一系列倍比稀释，进行半定量测定。

注意事项

1）受检样本和试剂加入顺序应严格按操作步骤顺序进行。

2）应在较强的自然光下进行结果观察。

（二）胶乳免疫测定法

胶乳免疫测定法（latex immunoassay，LIA）是建立在胶乳凝集定性试验基础上发展起来的一种非放射性均相免疫测定法，可以对微量的抗原物质和小分子半抗原（如药物、甾体激素等）进行精确的定量测定。

测定方法主要有粒子计数法和比浊法两种，原理及应用分别介绍如下。

1. 粒子计数法

根据抗体致敏的胶乳微粒，与相应的抗原结合发生凝集反应，使原来处于分散状态的胶乳微粒数量减少。待检物浓度越高，凝集反应越强，游离胶乳微粒越少，通过计数反应前后游离状态胶乳微粒数量的变化，就能对待检物做出定量分析。此方法操作简便，灵敏度高，一般检测范围为 0.1～1ng/ml，对胰岛素测定的灵敏度可高达 1pg/ml；此法可用于多种血清蛋白、多肽激素、RF、CRP、β_2-微球蛋白、病原微生物抗原及某些半抗原药物（如洋地黄）等数十种物质的测定（Collet-Cassart et al.，1983）。

2. 比浊法

免疫微粒与其相应的抗原（或抗体）结合后形成凝集颗粒，使反应混合物系统的浊度变小，透射光增强。可利用实验室常用分光光度计以 340～500nm 波长的入射光进行测定。比浊法的灵敏度约是 PACIA 的一半，可以满足许多分析物的免疫学定量测定要求。

（三）微粒固相免疫法

微粒表面吸附面积大，数量多，捕获较多的待测物，因此，微粒可作为载体。如在微粒上直接用荧光素、核素或酶标记显色，其敏感性极高。此项技术可用于测定体液中多种微量物质。

微粒固相免疫法测定血清中 TSHβ 含量

将特异性 TSHβ 抗体致敏的免疫微粒吸附待测血清中的可溶性抗原，然后加入荧光素标记的抗体与微粒上免疫复合物中的抗原结合（双抗体夹心法，两种抗体为针对 TSHβ 不同表位的抗体）。洗去多余的荧光抗体，通过荧光仪测定，测得的荧光强度与标本中待测物的浓度呈正相关。

材料与试剂

抗TSHβ抗体致敏的免疫微粒，荧光素标记的抗 TSHβ 抗体，待测血清，TSHβ 标准参考品，荧光检测仪

步骤

1）用过量的免疫微粒与待测标本反应，并以标准品作为阳性对照和反应标准曲线制作。
2）37℃1h，再加入荧光素标记的抗 TSHβ 抗体。
3）离心洗涤除去游离的荧光抗体，将微粒免疫复合物悬浮成均匀悬液。
4）用荧光检测仪测定。
5）结果观察和分析：以标准参考品的浓度为横坐标，相应的荧光强度为纵坐标，绘制出标准曲线。根据标本测得的荧光强度，从标准曲线上即可计算得知相应的 TSHβ 含量。

二、免疫磁性微粒检测技术

磁性微粒（magnetic microspheres，MMS）是 20 世纪 80 年代初，用高分子材料和金属离子为原料，聚合而成的一种以金属离子为核心，外层均匀地包裹高分子聚合体的固相微粒。在液相中，受外加磁场的吸引作用，MMS 可快速沉降而自行分离，无须进行离心沉淀。因此，将 MMS 应用于免疫检测，可使操作过程大为简化。经过特异性抗体包被制成免疫 MMS，与检样中的抗原结合形成免疫 MMS-靶分子（或靶细胞）复合体，通过外加磁场的作用即可与其他成分分离开来。再以适当方式使复合体解离，在磁场吸引下除去游离的免疫 MMS。此方法常广泛应用于细胞分离及分子生物学方面（详见第十六章）。

三、脂质体微粒检测技术

脂质体微粒检测技术是近年来人们发现的一种新型固相载体微球。脂质体（liposome）最早是在 1965 年被英国学者 Bangham 等作为研究生物膜的模型提出的，它是由一种人工合成的双分子类脂组成的封闭囊性小球，其结构与生物膜相似，内含有水相空间，可包裹药物、毒素、核酸（DNA、RNA）等溶质分子，使其有选择地作用于靶器官，发挥更有效的作用。脂质体的靶向性分为主动靶向、被动靶向和物理化学靶向 3 种。其中，主动靶向是修饰脂质体如微粒与配体（如单克隆抗体、缩氨酸、蛋白质等）偶联，以提高药物微粒的靶向性和与靶组织的结合亲和力，增加药物在靶组织中的沉积量。脂质体的研究主要集中在 4 个领域：模拟膜的研究；药物的可控释放和体内的靶向给药；皮肤及化妆品等日用工业品的基质；基因及其他生理活性物质向细胞内的转运。根据脂质体特性人们建立了一类新型免疫测定方法——脂质体免疫试验（liposome immunoassay，LIA）。下面介绍此类方法的特点和试验类型。

（一）LIA 的特点

LIA 是一类体外利用细胞裂解素（补体、磷脂酶、蜂及蛇毒素等以及非离子型去

污剂 Triton X-100）溶破脂质体，释放出溶质作为指示剂，或使脂质体致敏以增加凝集程度而指示抗原抗体是否发生反应的新型免疫测定技术。脂质体作为固相微球应用于免疫测定的先决条件是免疫脂质体，也就是说脂质体的致敏。

脂质体的制备原料磷脂酸乙醇胺（PE）或二棕榈酸磷脂乙醇胺（dipalmitoylphosphatidyl ethanolamine，DPPE）可与多种抗原、半抗原（如地高辛、茶碱），或交联剂［如琥珀亚胺马来酰胺苯丁酸（SMPB）和丙酸吡啶二硫基酯琥珀酰亚胺（SPDP）］等人工合成 PE 衍生物，如 PE-茶碱、马来酰胺苯丁酸（MPB)-PE 及二硫基吡啶（DTP)-PE 等。因此，由这些 PE 的衍生物制备得到的脂质体，膜上表达有相应的茶碱等半抗原，可与抗体或 Fab 片段巯基反应的马来酰胺基或 DTP 基团结合，进而将抗体或其 Fab 片段偶联于脂质体上，得到免疫脂质体。脂质体致敏方法简单、多样可用于定性或定量测定抗体或抗原（李金明，1995）。

（二）LIA 的检测模式

根据 LIA 反应体系发生颜色或状态改变的物质，主要包括补体介导的溶破法、细胞膜裂解素溶破法、阳离子反应染料法、凝集增强法、固相脂质体免疫试验、靶敏感免疫脂质体免疫试验等。

补体介导的溶破法检验人血清中胰岛素含量（罗招凡等，1999）

补体介导的溶破法（complement-mediated lysis）亦称脂质体免疫裂解试验（liposome immunalysis assay，LILA），是指脂质体膜上的抗原抗体免疫复合物激活补体后，导致脂质体裂解。LILA 是一种快速、简便、灵敏的免疫分析方法，为抗原或抗体物质的测定提供了一条新途径。主要包括 3 种测定方法。

（1）直接测定法。偶联于脂质体膜上的抗原在与抗体反应后形成脂质体-抗原-抗体免疫复合物，随后激活加入的补体，活化补体经典途径裂解脂质体，释放出内容指示剂。释放量与待测抗体的浓度成正比。

（2）竞争抑制测定法。在同一个反应体系中，加入抗体偶联脂质体、待测抗原及一定量的已知抗体，抗体偶联脂质体和待测抗原相互竞争与已知抗体，加入补体后，补体途径激活，释放出内容指示剂，指示剂释放量与待测抗原量呈反比。

（3）双抗体夹心测定法。将针对特定抗原的鼠单克隆抗体或山羊等动物的多克隆抗体 IgG（或其 Fab′片段）偶联于脂质体上作为一抗，以抗特定抗体的抗体为二抗，在此反应体系中，加入上述脂质体-一抗偶联物，与待测抗原形成脂质体-一抗-抗原-二抗夹心结构，抗原、二抗可有效地激活随后加入的补体而使脂质体裂解，内容指示剂的释出量与待测抗原的浓度成正比。

材料与试剂

ZFQ85A 型旋转蒸发器，JC-3 型超声处理机，Beckman 高速离心机，SN-682 型放射免疫 γ 计数器，724 微机型分光光度计

二棕榈酸磷脂酰胆碱（DPPC），二棕榈酸磷脂酰乙醇胺（DPPE），胆固醇（Chol），丽丝胺罗丹明 B，碳二亚胺（EDCI）

胰岛素干粉，胰岛素标准品，溶血素

250U/ml 补体（取 2～3 只体重 450g 左右的健康雄性豚鼠的心血，即时分离血清，混合分管冻存于－30℃冰箱，用时取出一管，试验前用溶血素行效价滴定），豚鼠抗人胰岛素 IgG

氯仿，乙醚，氯化镁，氯化钙，巴比妥盐，明胶

步骤

1. 脂质体制备

采用逆向双蒸发法（Szoka and Papahajvpoulos，1978）制备脂质体。具体方法如下：在 50ml 圆底烧瓶内，将 36μmol DPPC、33μmol Chol、6μmol DPPE 溶于 3ml 氯仿/乙醚（体积比＝1/2）中，置于旋转蒸发器上，于 38℃减压条件下旋转蒸发 30min，速度选择 190r/min，除去有机溶剂，形成一均匀薄膜，然后用 12ml 氯仿/乙醚（体积比＝1/2）复溶，再加入 4ml 的 0.1mol/L 丽丝胺罗丹明 B（溶于 pH7.4 VB 液），超声破碎 2～3min，形成均质乳相，复置旋转蒸发器上，42℃减压条件下，旋转蒸发 1h，速度选择 150r/min，大量气泡停止产生后再蒸发 20min，以去除残存的有机溶剂。为了分离未包裹的丽丝胺罗丹明 B，选用 20 000g 连续反复离心 5 次，至上清无色清亮为止。离心缓冲液用 pH7.4 的 VB 液。最后将离心沉淀重悬于 3ml pH7.4 GBV 液中，经 0.45μm 的微孔滤膜过滤处理。

2. 免疫脂质体制备

实验分两组，一组为加 EDCI，另一组不加 EDCI 作为对照组，取 0.3ml 自制脂质体于实验各管，第一组各管内分别加入 0.4ml 的 20%EDCI（溶于 pH7.4 GVB 液）和 4ml 的 1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/ml 胰岛素液（溶于 pH7.4 GVB 液）的混合反应液；第二组 EDCI 液用 GVB 液取代，混合各管后于 24℃静置 2h，12 000g 4℃离心，弃上清，用 GVB 液重复洗涤离心 5 次，弃上清，最后将各管沉淀脂质体重悬于 0.3ml GVB 液，各取 10μl 脂质体稀释 10^4 倍，放射免疫法测定免疫脂质体上偶联胰岛素浓度。

3. 胰岛素检测

免疫脂质体用前稀释 100 倍，实验稀释液均为 GVB 液。取 150μl 系列标准胰岛素液并做倍比稀释（浓度分别为：0μU/ml、5μU/ml、10μU/ml、20μU/ml、40μU/ml、80μU/ml、160μU/ml、320μU/ml）或待测血清样品（试验前经 56℃ 30min 灭活）和 100μl 1∶160 豚鼠抗人胰岛素 IgG 混合，加 100μl 免疫脂质体，3.0U（CH50 单位）补体混合后，用 GVB 液稀释至 500μl，于 37℃温育 1h，加 2ml 0.01mol/L EDTA-VB 液，置 4℃20min 终止反应。

4. 结果观察和分析

在 565nm 处读取吸光度值。对照管用 GVB 液取代豚鼠抗人胰岛素 IgG。

注意事项

1）待测血清在试验前应需 56℃ 30min 处理，以灭活血清中的补体成分。

2）制备好的免疫脂质体需放4℃保存，备用。

（王春梅）

参考文献

兰小鹏．1994．免疫微球技术进展．国外医学．临床生物化学与检验分册，15(4)：146～149.

李金明．1995．脂质体——一种新的免疫测定固相载体微球．国外医学，临床生物化学与检验分册，16(6)：263～265.

罗招凡，刘剑雄，张平安．1999．脂质体免疫裂解试验检测人血清胰岛素的初步研究．临床检验杂志，17(1)：112～124.

沈关心，周汝麟．2002．现代免疫学实验技术．第二版．武汉：湖北科学技术出版社．95～98.

Chart H, Cheesbrough J, Waghorn D, et al. 2000. The serodiagnosis of infection with *Salmonella typhi*. Clin Pathol, 53 (11): 851～853.

Collet-Cassart D, Mareschal JC, Sindic CJM. 1983. Automated particle-counting immunoassay of C-reactive protein and its application to serum, cord serum, and cerebrospinal fluid samples. Clin Chem, 29(6): 1127～1131.

Daurat G, Feissel M, Jimenez E, et al. 2002. Validity of pretransfusion bedside agglutination tests for pretransfusional control. Transfus. Clin Biol, 9 (4): 258～264.

El Amiri B, Melo de Sousa N, Mecif K, et al. 2003. Double radial immunodiffusion as a tool to identify pregnancy-associated glycoproteins in ruminant and nonruminant placentae. Theriogenology, 59(5-6): 1291～1301.

Harriet C, Isom Ingo, Georgoff I. 1984. Quantitative assay for albumin-producing liver cells after simian virus 40 transformation of rat hepatocytes maintained in chemically defined medium. Proc Natl Acad Sci USA, 81 (20): 6378～6382.

Mansueto S, Miceli MD, La Cascia C, et al. 1980. Further observations on the use of counterimmunoelectrophoresis (CIEP) on cellulose acetate membrane (Cellogel) in the diagnosis of visceral leishmaniasis (author's transl). Quad Sclavo Diagn, 16(3): 258～266.

Szoka F Jr, Papahajopoulos D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc Natl Acad Sci USA, 75(9): 4194～4198.

第二十五章　流式细胞术

流式细胞术（flow cytometry）是20世纪70年代开始逐渐发展起来的一种快速的细胞定量分析和精确分选的新技术，通过光电系统记录细胞的散射光信号和荧光信号快速检测分析单个细胞的多个物理特性，如细胞的大小、颗粒度和相对的荧光强度。它的出现促使了多个领域的进步，是包括生物学、光电子物理、单克隆抗体技术、细胞荧光化学、计算机科学、流体力学、激光技术、高等数学等多学科知识综合运用的结晶。

随着各学科技术的不断进步和流式细胞术自身几十年的发展以及流式细胞仪的日臻完善，流式细胞术已经成为细胞学领域无可替代的重要工具。流式细胞术不仅广泛应用于基础医学研究，还广泛应用于临床，如临床上血液常规检查使用的血液自动分析仪就是流式细胞术应用于临床的典范，而且它只是流式细胞术的一个简单应用，尚未应用到流式细胞术强大的荧光技术；另外，利用流式细胞术可以进行白血病的临床免疫学分型，血小板功能检测，还可以通过检测细胞的DNA用于临床肿瘤的诊断等。

流式细胞仪根据其结构和应用的不同主要分为分析型流式细胞仪和分选型流式细胞仪，本章除了具体介绍这两种仪器的基本结构和原理，还主要介绍流式细胞术在免疫学上的具体应用。

第一节　流式分析

一、原理

（一）分析型流式细胞仪

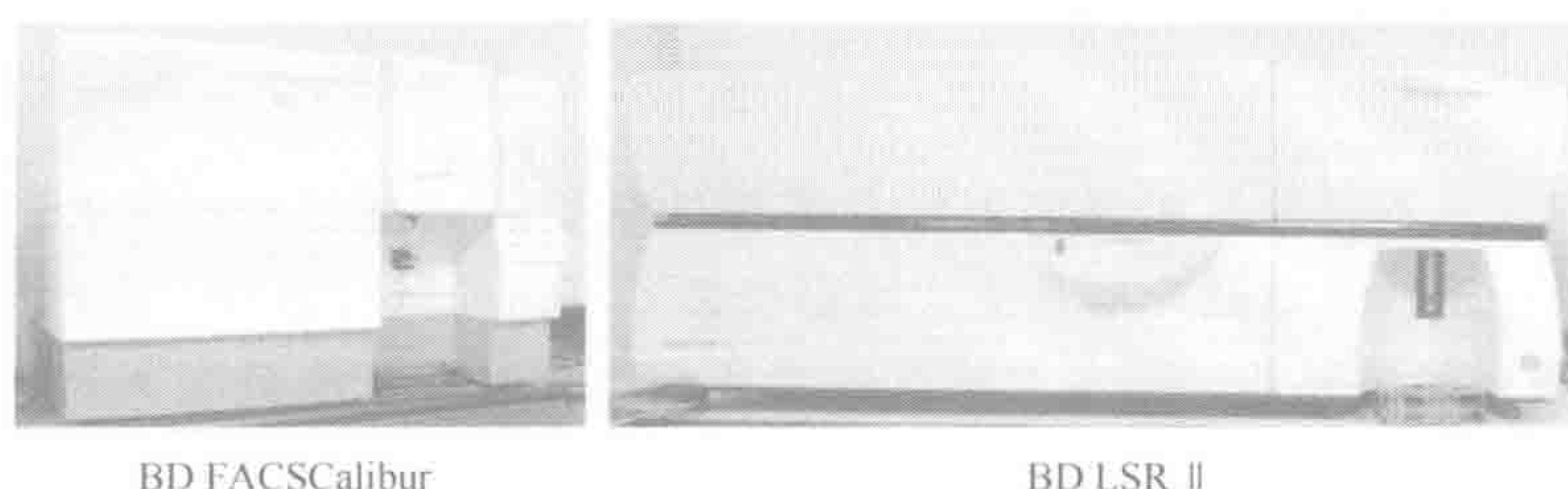
流式细胞术发展到现在，技术已经比较成熟，出现了许多专门研制各种流式细胞仪的公司，如BD公司、贝克曼（Beckman）公司等。目前流式细胞仪的种类较多，可以根据目的不同选购合适的流式细胞仪。选购分析型流式细胞仪需要重点关注其中几个重要的参数，如最高分析速度、激光器数和荧光通道数。

最高分析速度是指分析型流式细胞仪在一秒钟内最多能够正确分析的细胞或者颗粒数。能够分析的数目越多，说明仪器越精密，就能节省大量上样分析时间。

激光器数和荧光通道数是另一个必须考虑的参数，用户可以根据自己不同的需要来选购。如果不需要进行多色分析，可以只安装一个激光器，如最常用的488nm的激光器。488nm激光器发射的激发光，作用在不同的荧光素上可以产生不同波长的发射光，而分别分析不同波长的发射光的强度，就可以得到不同的结果，这就是多通道分析，如FITC荧光素、PE荧光素、PEcy5或Percp荧光素被488nm的激光激发后发射的荧光

波长不同，即可同时分析由它们所标记的目标分子。如果需要做四色以上的分析，就需要再增加一个激光器，如 635nm 的激光器，即可以使用 APC 荧光素标记的抗体。另外，如果有特殊需要，如需要分析 SP（side population）侧群细胞，就需要安装紫外光 405nm 的激光器。

图 25-1（见书后彩图）所示是 BD 公司的两款分析型流式细胞仪。



BD FACSCalibur　　BD LSR Ⅱ

图 25-1　分析型流式细胞仪

（二）基本结构与原理

流式细胞仪的工作原理简单说就是通过高压形成一条高速流动的极细的液柱，液柱中的细胞只能单个依次高速通过，当激光照射到液柱中高速流过的细胞时，收集分析散射光和荧光信号从而得到细胞的各种特征。分析型流式细胞仪的结构主要分为 3 个系统：液流系统、光路系统和检测分析系统。

1. 液流系统

流式细胞仪的液流系统主要由两条相对独立而又紧密联系的液流组成，分别为鞘液流和样品流。鞘液流的鞘液来自于鞘液桶，流经流动室（又称为喷嘴）后与来自于样品管的样品流汇合，最后流到废液桶。

流经流动室的鞘液流和样品流并没有相互混合在一起，而是形成层流，样品流在内，鞘液流在外。流动室的出口直径很小，根据规格的不同有 70μm、100μm、200μm 等，免疫学研究最常用的是 70μm 的喷嘴，所以流动室流出的液流很细，位于中央的样品流就更细，从而保证样品流中的细胞只能以单个细胞的方式依次排列在样品流中，这种单个细胞依次经过的样品流被激光照射后，通过接收散射光和荧光信号就能得到每个细胞的数据（图 25-2）。

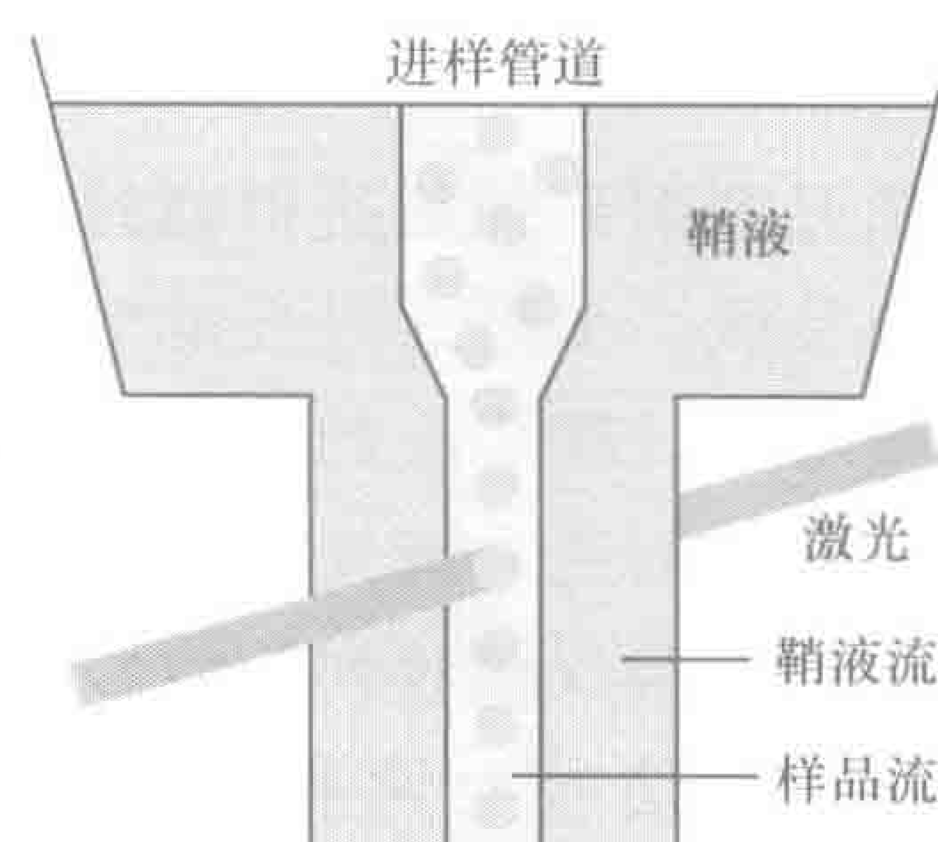


图 25-2　流动室示意图

鞘液流和样品流的压力是不同的，一般样品流的压力要大于鞘液流，这样有利于维持它们之间形成的层流。在上样时，鞘液流的压力是不可控的，而样品流的压力是可控的。上样速度控制就是通过控制样品流和鞘液流的压力差来实现的，压力差越大，样品流的直径就越大，单位时间内流过的液体量就越大，上样速度就越快。分析型流式细胞仪的压力差大小通常不是连续控制的，而是设置了几个上样速度

的级别，如 BD LSRII，有低速、中速、高速 3 个按钮可供选择来控制上样速度。

速度提高，样品流的直径就会变大，样品流内的细胞有的可能会偏离中心，从而偏离激光，有的可能两个细胞会有部分同时出现在一个平面，分析得到的数据就会有偏差，当然，这种误差在一定程度上是可以接受的。对于一些定性的分析可以采用高速分析，但是对于一些比较精确的分析如测量细胞内 DNA 的含量等最好采用低速分析，这样得到的结果会比较准确。

2. 光路系统

流式细胞仪是通过分析激光照射样品流中的细胞后的散射光和发射的荧光来工作的，因此发射特定波长的激光器是流式细胞仪必不可少的组成部分。最常用的激光器是发射 488nm 激光的激光器，基本上所有的流式细胞仪都应配有此激光器。有些流式细胞仪还配有其他的激光器，如可以激发 APC 荧光的 635nm 的激光器，可以激发 Hoechst 的 405nm 的紫外激光器等。

流式细胞仪的光路系统是由若干透镜、滤光片和小孔等组成的，主要通过滤光片将接收到的散射光和荧光根据波长的不同分开，通过相应的光电倍增管（photomultiplier tuber，PMT）得到数据加以分析。流式细胞仪的滤光片主要有 3 类：长通滤片（long pass filter）、短通滤片（short pass filter）和带通滤片（band pass filter）。长通滤片使特定波长以上的光可以通过，该波长以下的光则被反射；短通滤片使特定波长以下的光可以通过，该波长以上的光则被反射；带通滤片可允许相当窄的一段波长范围内的光可以通过，该范围外波长的光将被反射。

这 3 种滤光片相互组合，可以将散射光和荧光根据波长不同分开，然后被不同的检测通道接收加以分析。例如，检测 FITC 和 CFSE 荧光的第一通道接收到的是 510nm 至 550nm 之间的光，这个通道最后是通过一个带通滤片实现的，该带通滤片可以让 510nm 和 550nm 之间的光通过，在其范围外的其他波长的光将被反射。

3. 检测分析系统

激光照射到细胞后得到的散射光和荧光经光路系统被分成不同波长的光被各自的检测通道接收，最后通过光电倍增管被转换为电子信号。光电倍增管不仅能将光信号转换为电信号与计算机上的特定软件相连被处理分析，同时还能大幅度增强信号，因为一个细胞上的散射光和荧光都很弱，经过光电倍增管的增幅后才能被分析处理。

流式细胞仪接收到的信号主要有两种，即散射光信号和荧光信号。

散射光信号有两种，前向角散射（forward scatter，FSC）和侧向角散射（side scatter，SSC）。FSC 是激光通过细胞后在激光正前方接收到的散射信号，它的值反映细胞的大小。一般情况下，一个细胞的 FSC 越大，代表其体积越大。通常选用 FSC 作为阈值参数，如将 FSC 阈值设为 5%，表示 FSC 值最小的 5%的信号将不被分析，因为这些信号代表的不是细胞，而是一些细胞碎片或者小颗粒等。SSC 是激光通过细胞后在激光的 90°位置上接收到的信号，它的值反映细胞的颗粒度，一般来说，一个细胞的 SSC 越大，代表其颗粒度越大。例如，细胞形态不规则，细胞膜多突起，胞质内颗粒较多等。FSC 和 SSC 是一个细胞的固有参数值，与其是否标有荧光偶联抗体无关，是

流式细胞术中非常重要的两个参数。

当细胞标记有荧光偶联抗体时，在相应的激光激发下就会产生荧光，在激光 90°位置（同 SSC）接收到荧光然后经过光路系统，在相应通道经光电倍增管就能得到荧光信号。根据是否接收到荧光信号，可以判断该细胞是否表达相关分子，根据相对荧光强度，可以判断细胞表达相关分子的多少。荧光信号分析是流式细胞仪的重要功能特点，也是其应用广泛的原因之一。

（三）流式图

流式细胞术是基于细胞群体的研究，而细胞群体内每个细胞各自的参数都不同，而且每个细胞的参数不止一个，那么如何才能直观准确的表达一群细胞的流式结果呢？目前，流式分析软件是采用流式图来分析处理流式结果。流式图最为常用的是直方图和散点图，其他流式图并不常用，在此不做具体介绍。

1. 直方图

直方图只能表示一群细胞某一个参数的情况，外观看似曲线图，通过曲线下面所占的面积来表示某个特征的细胞所占的比例。直方图的 x 轴表示参数的大小，如 FSC 或 SSC 的大小、某个通道的荧光强度等；y 轴表示数量，曲线上的每个点表示所分析的细胞群体中散射光强度或荧光强度等于所对应 x 轴上值的细胞数。

图 25-3D（见书后彩图）就是一副直方图，整个图显示的是小鼠脾脏的淋巴细胞，x 轴表示的是标记荧光偶联抗 CD4 单抗后的荧光强度值，y 轴表示数量。从图中可以明显看出有两个峰，荧光强度弱的那个峰（左边）表示的是 CD4 阴性细胞，而荧光强度强的那个峰（右边）则表示的是 CD4 阳性细胞，阳性细胞比例是根据面积来计算的，占 25%左右。

2. 散点图

散点图是最常用的流式图，它可以表示一群细胞两个参数的情况。x 轴表示一个参数（散射光强度或荧光强度），y 轴表示另外一个参数，图中的每一个点都代表一个细胞，该点所对应的 x 值和 y 值就代表这个细胞 x 轴和 y 轴所代表的参数的值。

图 25-3A（见书后彩图）是正常人外周血单个核细胞（PBMC）的 FSC-SSC 散点图。一般情况下，流式分析的第一张图就是 FSC-SSC 图，它能够根据细胞的大小和颗粒度先简单的区分细胞群体，然后再具体研究目标细胞。从图 25-3A（见书后彩图）中可以看到细胞明显地分成了几个群体，分别用不同的颜色来表示，细胞体积和颗粒度较小的红色群体是淋巴细胞群，细胞体积和颗粒度较大的绿色群体是单核细胞群，细胞体积和颗粒度最大的黄色群体是粒细胞群。

图 25-3B（见书后彩图）是肝细胞癌患者肿瘤远端肝组织内浸润的淋巴细胞的散点图，显示了这群淋巴细胞表达 CD3 和 CD56 的情况。从图 25-3B（见书后彩图）中可以看出细胞分为 4 群：左下象限的细胞表示的是 CD3 和 CD56 双阴性的细胞，可能主要是 B 细胞；左上象限的是 CD3 阳性和 CD56 阴性的细胞，即 T 细胞群；右下象限的是 CD3 阴性 CD56 阳性的细胞，即 NK 细胞群，右上象限的是 CD3 和 CD56 双阳性的细

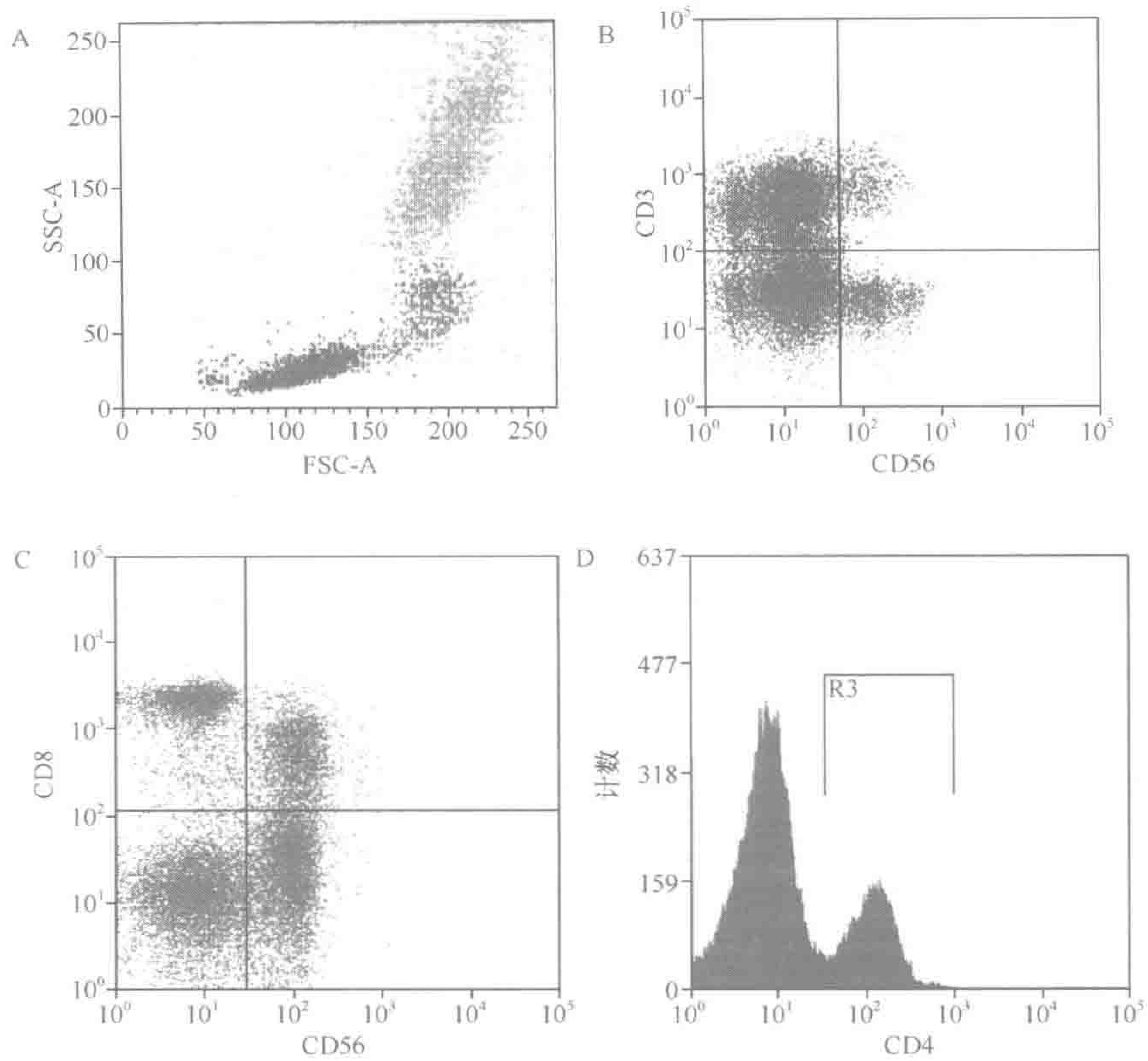


图 25-3　流式图

A. 人外周血淋巴细胞；B、C. 淋巴细胞散点图；D. 淋巴细胞直方图

胞，即 NK T 细胞。

图 25-3C（见书后彩图）是正常人 PBMC 中淋巴细胞群，即图 25-3A（见书后彩图）中红色细胞群的散点图，显示了这群淋巴细胞表达 CD8 和 CD56 的情况。从图 25-3C（见书后彩图）中可以看出细胞分为 4 群：左下象限的细胞表示的是 CD8 和 CD56 双阴性的细胞，应该包括 $CD4^+$ T 细胞和 B 细胞；左上象限的是 CD8 高表达 CD56 阴性的细胞，即 $CD8^+$ T 细胞群；右下象限的是 CD8 阴性 CD56 阳性的细胞，即 NK 细胞群；右上象限的是 CD8 中表达 CD56 阳性的细胞，可能是 NK T 细胞群。

需要注意的是流式图中数轴的数据表示形式，用常用的是长度形式和 log 形式。长度形式用于散射光和荧光强度呈倍数递增的情况，FSC 和 SSC 散射光强度一般呈倍数递增，用长度形式表示，测细胞的 DNA 含量，用紫外激光检测 SP 侧群细胞时其荧光强度呈倍数递增，其数轴也用长度形式。而大部分荧光强度都呈指数递增，其数轴一般用 log 形式。

二、基本操作

（一）样品制备

流式细胞仪是对单个独立的细胞进行操作，因此要求样品是单细胞悬液，这节简单介绍如何制备单细胞悬液。

如果目标细胞原本就处于单细胞状态，则制备单细胞悬液就较为简单。如目标细胞是来源于PBMC，那么只要用Ficoll密度梯度离心就能得到单个核细胞，再用PBS洗涤、重悬即可。如目标细胞是来源于胸水、腹水或者脑脊液等体液，只要将各种体液离心沉淀，用PBS洗涤几次，最后用滤网过滤即可。如目标细胞是体外培养的细胞，若为悬浮细胞，直接收集即可，若是贴壁细胞，用胰酶消化后收集即可。

如果目标细胞是免疫器官内的细胞，如骨髓、胸腺、脾脏和淋巴结等，由于这些组织器官主要由免疫细胞组成，细胞与细胞之间的紧密接触很少，而且其中含有的纤维结缔组织较少，所以可以直接采用机械研磨法得到单细胞悬液。骨髓比较特殊，其组织疏松，不用研磨，反复吹打几次就可以得到单细胞悬液。胸腺、脾脏和淋巴结，只要用研磨棒经钢网将其磨碎，然后用滤网过滤一次就可以得到单细胞悬液。注意研磨棒与组织接触的部位不要太硬，最好是有一定弹性的橡胶，如注射器的内芯，同时研磨时不要太用力，否则得到的单细胞悬液会有很多死细胞和细胞碎片，影响实验结果。

如果目标细胞来自实体脏器，如肺脏和肝脏，可以用酶消化法得到单细胞悬液。将实体脏器用剪刀剪成细小的碎片，加入用于消化的Ⅳ型胶原酶，置于37℃孵箱中消化，消化的时间根据脏器的不同而不同，然后用研磨棒磨碎过滤就可以得到单细胞悬液。肿瘤也可以被看做是实体器官，也可以用相同的方法得到单细胞悬液。得到的单细胞悬液多数是组织细胞，免疫细胞的比例较低，这时可以使用密度梯度离心的方法将免疫细胞与组织细胞分开，然后直接分析纯化后的免疫细胞。

（二）荧光偶联抗体及其标记方法

流式细胞仪可以根据细胞的大小和颗粒度来区分细胞，如临床上使用的血常规分析仪就是以此来区分不同的血细胞。但是只得到细胞大小和颗粒度的差别并不能满足研究需要，当然也不是流式细胞仪的优势所在，利用荧光偶联抗体得到细胞表达某种抗原分子的情况，以此来区分细胞才是流式细胞仪的重要应用所在。为了检测细胞是否表达某种抗原分子，可以利用这种抗原的单克隆抗体，与特定的荧光素偶联，通过特定的激光来激发荧光，分析荧光素的发射荧光强弱来获得细胞表达相应抗原分子的情况。

1. 荧光素发射荧光的基本原理

荧光素受到其特定波长的激光（激发光）激发后，其原子核外层的电子能够吸收这种激光的能量，使其由原来处于的基态轨道跃迁到激发态的轨道上面，由于处于激发态轨道的电子是不稳定的，它会自发的从不稳定的激发态回到基态，同时释放出一定波长的荧光（发射光）。不同的荧光素都有自己特定的激发光和发射光，因此可以同时标记不同的荧光素偶联的抗体，用各自特定波长的激光同时激发，通过分析各自的发射光的

强度同时得到不同的抗原表达情况，这就是流式细胞仪多通道分析的原理。

2. 流式常用荧光素

表 25-1 表示的是流式常用的各种荧光素的基本信息，包括激发光波长和发射光波长，以及该荧光素的主要应用。

表 25-1　流式常用荧光素

荧光素	中文名称	激发光/nm	发射光/nm	主要应用
FITC	异硫氰酸荧光素	494	518	常规
PE	藻红蛋白	488	578	常规
PerCP	叶绿素蛋白	470	670	常规
APC	别藻蓝蛋白	650	660	常规
PE-Cy5	藻红蛋白-花青素 5	488	670	常规
PE-Cy7	藻红蛋白-花青素 7	488	770	常规
APC-Cy7	别藻蓝蛋白-花青素 7	647	774	常规
CFSE	琥珀酰亚胺脂*	494	518	细胞增殖
GFP	绿荧光蛋白	488	510	报告分子
Hoechst33342	烟酸己可碱 33342	350	470	DNA 分析
PI	碘化丙锭	495	637	DNA 分析
7-AAD	7-氨基放线菌素 D	546	655	细胞死亡

* 全称为羟基荧光素乙醋酸盐琥珀酰亚胺脂。

很多生物公司都提供有常规的抗原分子的荧光素偶联的单克隆抗体。用户可以根据自己的需要，选购不同荧光素偶联的抗体。

3. 封闭

抗体可以分为两个部分——Fab 段和 Fc 段，Fab 段能够特异性的与其相对应的抗原表位结合，这就是利用荧光偶联抗体检测相应抗原的基本原理。但是抗体的 Fc 段能够与 Fc 受体非特异性的结合，而很多免疫细胞都表达 Fc 受体，如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、NK 细胞等。这种非特异性的结合是应该避免的，可以通过封闭的方法来避免这种因抗体的 Fc 段与 Fc 受体的非特异性结合而引起的假阳性结果。

封闭的方法：①样品准备标记荧光偶联抗体前，用抗 CD16 和抗 CD32 单克隆抗体封闭样品中细胞表面的 Fc 受体，混匀后 4℃静置 15min。②样品准备标记荧光偶联抗体前用全 IgG 抗体封闭样品中细胞表面的 Fc 受体，混匀后 4℃静置 15min。荧光偶联抗体是小鼠来源时用小鼠全 IgG 封闭，是大鼠来源时用大鼠全 IgG 封闭。

当然，荧光偶联抗体与样品细胞的种属不同。例如，小鼠细胞流式分析所用的荧光偶联抗体一般来源于大鼠，人细胞流式分析所用的荧光偶联抗体一般来源于小鼠。一般情况下，不同种属间的抗体 Fc 段与 Fc 受体之间结合的可能性较小，但是不能保证由于种属间差异较小而有结合，从而出现假阳性影响实验结果的情况出现，所以在标记荧光偶联抗体之前先封闭样品是流式细胞术一个比较好的习惯。

4. 荧光偶联抗体标记方法

荧光偶联抗体的标记方法主要有直接标记法和间接标记法两种，直接标记法是指直接标记荧光偶联抗体，而间接标记法是指先标记生物素（biotin）偶联的单克隆抗体，然后再标记荧光素偶联的亲和素（avidin）。直接标记法方法简单，结果明确，但是由于其偶联的荧光素是确定的，只能由特定的通道检测，当进行多次分析时，就可能出现通道重叠。间接标记法比直接标记法步骤多，时间长，产生非特异性结合的可能性也增加，但是其优点在于其灵活性。两种标记方法各有优缺点，可以结合起来使用，一般如果只需要单色分析，推荐使用直标抗体；如果需要分析的抗原需要与其他多种抗原同时分析，可以考虑使用间标抗体，这样就可以合理搭配检测的通道。

抗体的标记方法比较简单，样本封闭后加入适量浓度的相应荧光偶联抗体，4℃静置30min即可。注意加入抗体后需充分混匀样品，使抗体与样品充分结合。30min后用PBS洗2遍将游离的抗体洗掉即可上样。

（三）对照的设置

阴性对照的设置是流式细胞术一个非常重要的环节，不可缺少。因为只有设置了阴性对照，才能通过流式图上的荧光强度来判断细胞是否表达相应的抗原分子。每一个细胞都会发射非特异的荧光，而且不同细胞的非特异荧光有时相差会很大。所以必须同时准备一份用来标记相应荧光偶联抗体的同型对照抗体样品，一般生物公司都会提供荧光偶联抗体的同型对照。

细胞的非特异荧光与细胞的表面积大小有关，一般情况下，细胞表面积越大，颗粒度越高，即其FSC-SSC值越大，自发荧光就越高，尤其在分析脏器来源的样品时要注意，免疫细胞体积小，颗粒度小，自发荧光小，而组织细胞体积大，颗粒度高，自发荧光大，如果不设置组织细胞的阴性对照，使用免疫细胞的阴性对照作为阴阳性的界线，很可能将组织细胞的自发荧光当成阳性荧光，从而得到假阳性的结果。

另外，尤其要注意的就是死细胞，一般情况下，样品中或多或少都会有死细胞的存在，而死细胞的自发荧光要比活细胞强得多，如果不加仔细分析很可能将死细胞当作阳性细胞来分析。当然可以用7-AAD这种专门标记死细胞的荧光素来区分死细胞，但是在多色分析时不一定有条件专门为标记死细胞留出一个分析通道。通常不用7-AAD来标记死细胞，因为死细胞在所有通道的自发荧光都很强，所以在散点图上，死细胞就位于对角线上，可以利用死细胞的这个特点将死细胞排除在外。有时候散点图上的双阳性细胞可能会与死细胞重合在一起，这时可以利用另外两个非荧光偶联抗体标记通道的散点图来去除死细胞。

相对于阴性同型对照，阳性对照可能并不那么重要。一般情况下，向公司购买的荧光偶联抗体都可以正常使用，但是不能保证所有抗体都是合格的，可能会因为各种原因，如保存、运输的问题导致抗体失效。所以，在使用新的抗体前，最好用表达相应抗原的样品试标，分析是否能够正常标记阳性细胞，从而避免出现假阴性结果。

（四）补偿设置

补偿设置是流式细胞术中一个非常重要的环节，如果在多色分析时，没有设置相应的补偿，或者补偿设置不当，那么最后得到的结果很可能就是错误的。

流式细胞仪虽种类繁多，但其基本结构相差不多。激光发射到液柱中的细胞上，细胞上结合的荧光偶联抗体产生荧光，在 90°位置上接收到不同波长的荧光，仪器通过各种滤光片将不同波长荧光分开，进入不同的检测通道。一般情况下，一个检测通道可以检测一种以上的荧光素，但是一个通道一次只能检测一种荧光素，不能同时检测多种荧光素，而且一种荧光素一般只能在特定的通道内被检测。例如，第一通道接收 510～550nm 波长的荧光，可以检测 FITC、GFP 或 CFSE 荧光素发射的荧光，第二通道接收 565～595nm 波长的荧光，可以检测 PE 荧光素发射的荧光。

通道只能通过波长来区分不同的荧光，而不能区分这些荧光是来源于哪一个荧光素。而一种荧光素的发射光的波长并不是绝对固定于某一个数值，而是以某一特定数值为中心的不对称分布，如 FITC 的发射光的波长是 518nm，主要被第一通道接收，但是 FITC 也可能发射高于 565nm 的荧光（图 25-4（见书后彩图）），这时就不是被第一通道接收，而是被第二通道接收，而第二通道的信号被认为是 PE 的信号，所以这时如果同时标记 FITC 和 PE，那么第二通道包括大部分 PE 信号和小部分 FITC 信号，同理，小部分 PE 的发射光波长可能小于 550nm（图 25-4（见书后彩图）），从而被第一通道接收，这时第一通道就包括大部分 FITC 信号和小部分 PE 信号。所以，如果不调补偿，以第一通道代表 FITC 值，第二通道代表 PE 值的结果就与实际不符，得到错误的结果。

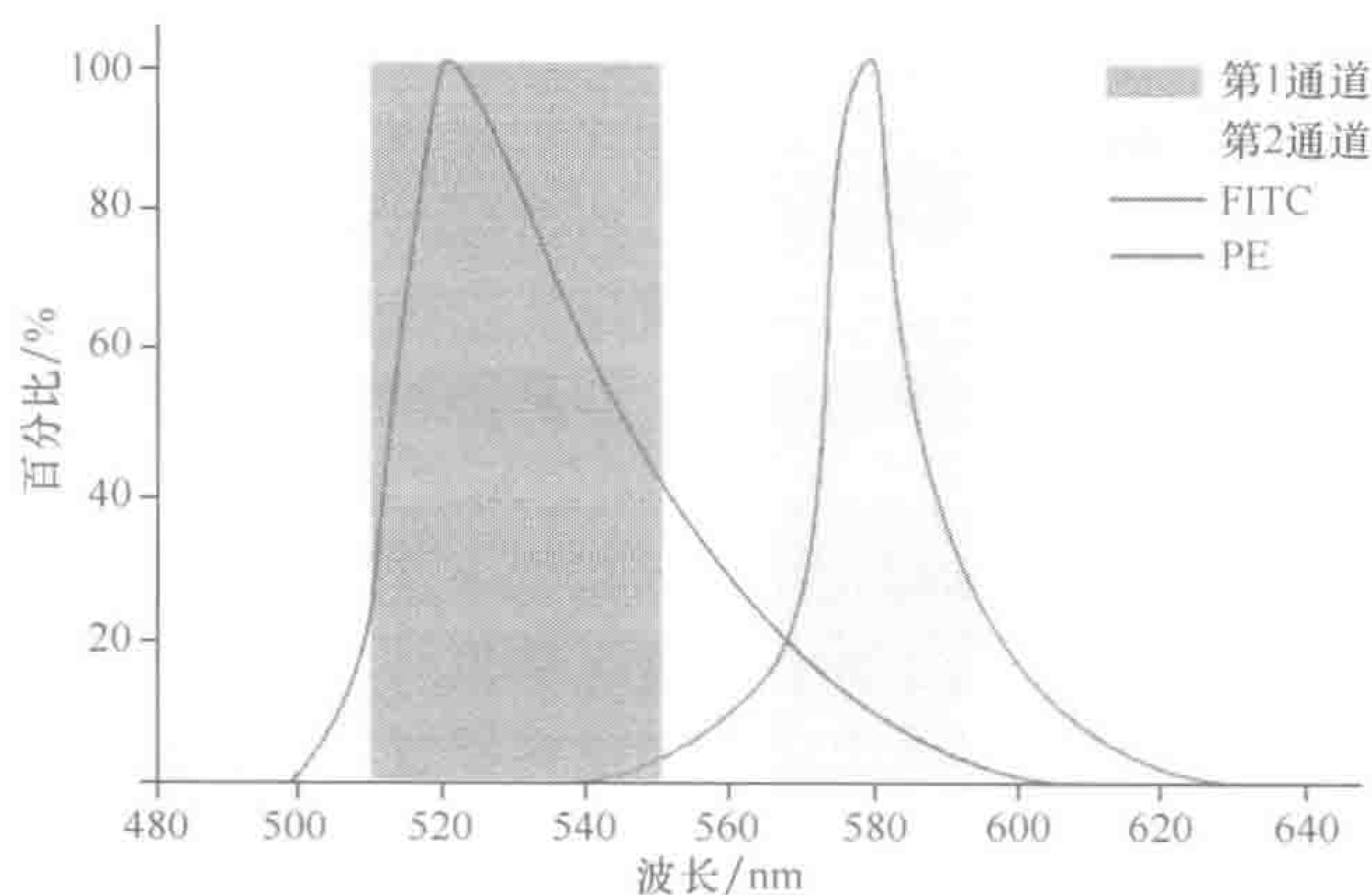


图 25-4　FITC 和 PE 发射荧光与第 1、2 通道关系图

调节补偿的目的就是为了排除这种错误，将 PE 的信号从第一通道内排除出去，使第一通道的值代表 FITC 的信息，将 FITC 的信号从第二通道内排除出去，使第二通道的值代表 PE 的信息。

图 25-5 显示的是 FITC 和 PE 之间的补偿调节，图 25-5A 未标记荧光抗体，作为阴

性对照，图 25-5B～图 25-5E 只标记 FITC 偶联抗体，未标记 PE 偶联抗体，图 25-5B 表示未调节补偿的流式图，可以看到虽然未标记 PE 抗体，但是第二通道（PE 通道）仍有荧光信号，这些荧光信号来源于 FITC 发射的荧光，所以必须将这部分荧光从第二通道内去除，即设定 PE-FITC 的补偿值，图 25-5C 表示将补偿 PE-FITC 值设定为 10％时，第二通道内仍有信号，说明补偿调节不够，图 25-5D 表示将值设定为 18％时的流式示意图，第二通道内没有 FITC 信号，且 FITC 阳性细胞的第二通道非特异荧光与阴性对照持平，补偿调节恰当，图 25-5E 表示将值设定为 30％时的流式示意图，第二通道内虽没有 FITC 信号，但是 FITC 阳性细胞第二通道非特异信号明显比阴性对照低，说明补偿调节过度。同理设置 FITC-PE 的补偿值，图 25-5F～图 25-5I 只标记 PE 偶联抗体，图 25-5F 表示未设置补偿值，图 25-5G 表示补偿调节不足，图 25-5H 表示补偿调节恰当，图 25-5I 表示补偿调节过度。

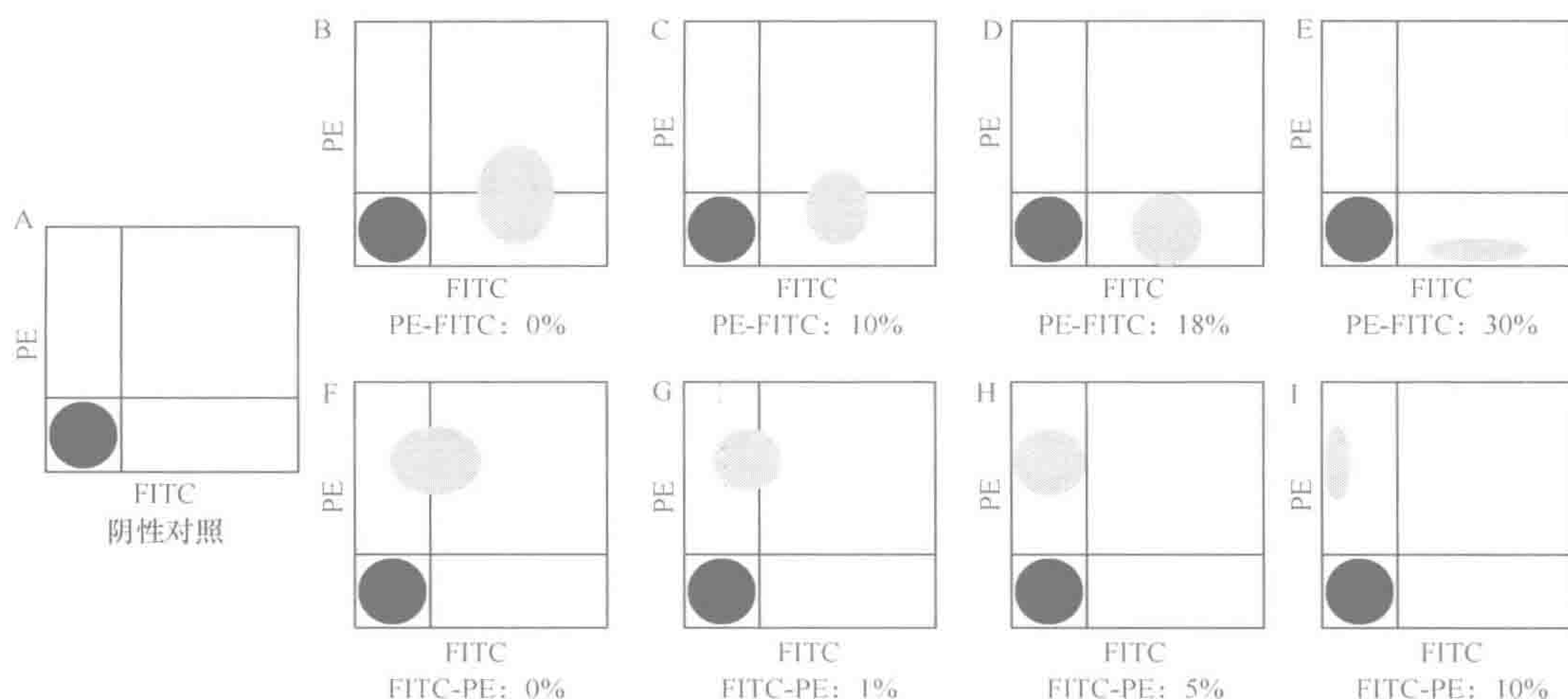


图 25-5　FITC、PE 双色补偿调节示意图

A. PE 和 FITC 分子的阴性对照；B～I. 不同补偿的双参数直方图

一般情况下，只需调节相邻通道之间的补偿即可，如第一通道只需与第二通道调节补偿，而不需与第三或第四通道调节补偿，而第二通道则需与第一通道和第三通道调节补偿。其他通道之间调节补偿的方法与 FITC 和 PE 通道之间调节方法类似，在此不做赘述。

补偿大小主要受仪器、荧光偶联抗体和细胞的影响，其中受仪器的影响最大，一般来说，某一型号的流式细胞仪都有自己相对固定的补偿值，不同型号仪器之间的补偿值可能相差较大。荧光偶联抗体对于补偿值大小影响不会很大，一般情况下，如用 FITC 偶联 CD4 单抗与 PE 偶联 CD8 单抗调节的补偿，可以适用于 FITC 偶联 CD3 单抗与 PE 偶联 CD19 单抗之间的补偿。但是某些荧光偶联抗体与其他荧光偶联抗体同时标记时，其补偿值可能会改变，如果不相应改变补偿的大小，可能得到的结果就有偏差，甚至得到完全错误的结果。所以，当使用新荧光偶联抗体时，最好先调节补偿，养成这个良好的习惯，以免因补偿不当得到错误结果。不同的细胞有时其补偿也会不同，尤其是大小

和颗粒度相差很多的细胞。例如，用淋巴细胞调节的补偿值可能不适用于肿瘤细胞，所以如果研究对象换为肿瘤细胞时，应该重新调节补偿值。

三、应用

（一）细胞亚群比例测定

测定某种细胞或者细胞亚群的比例，是流式细胞术最基本最简单的应用。首先要确定总体是什么，如要测定外周血中 $CD4^+$ T 细胞的比例，可以将外周血单个核细胞作为整体，也可以将淋巴细胞群作为整体，这要根据具体的研究目的做出决定。然后要明确需要测定的细胞群体或者亚群的表型，即区别于其他细胞群体的表面分子，如要测定 T 细胞群可以用抗 CD3 单抗来标记，B 细胞可以用抗 CD19 单抗来标记，C57 品系小鼠 NK 细胞可以用抗 NK1.1 单抗来标记，人 NK 细胞可以用抗 CD56 单抗来标记。有时候需要 2 个甚至 3 个表面标记分子来区分，如测定调节性 T 细胞的比例，通常用抗 CD4 单抗和抗 CD25 单抗来标记，将 CD4、CD25 双阳性的细胞视为调节性 T 细胞。

明确了总体和标志性表面分子后，测定比例就很简单，首先设置总体为门，使目标流式图上只显示作为总体的所有细胞，单标记的亚群可以用直方图表示，双标记亚群可以用散点图表示，多标记亚群可以用几个散点图表示。然后圈定细胞亚群，就可以得出细胞亚群的比例。

图 25-6 中，作者要测定在不同肿瘤模型不同的时间段小鼠脾脏内 $CD4^+CD69^+$ 新型调节性 T 细胞占 $CD4^+$ T 细胞的比例。图 25-6 中所示散点图中显示的细胞都是 $CD4^+$ T 细胞这个总体，即将 $CD4^+$ 细胞设为门，将门中的 CD69 阳性的细胞作为细胞亚群的标记，圈出 CD69 阳性的细胞就可以得出这群新的调节性 T 细胞亚群占 $CD4^+$ T 细胞比例的变化情况。从图 25-6 中可以看出，在 Hepa、3LL、B16 模型中，随着肿瘤的进展，该亚群在 $CD4^+$ T 细胞中的比例显著上升。

（二）表型分析

研究一群细胞，分析其表型特点是很重要的一环，不仅可以明确这群细胞的独特之处，而且对其功能也有很好的提示作用。

首先要明确所要研究的细胞群体或亚群的标志分子，在流式图上以所要研究的细胞设门，然后再分析其表型分子，最好一个表型分子用一张流式图表示，可以用直方图表示，也可以用散点图表示。如果该群细胞表达该表型分子有明显的阴阳性之分，可以用阳性比例来表示表型分子的表达情况；如果没有明显的阴阳性之分，可以用平均荧光强度来区分。例如，如果用比例来区分，可能都是 100％表达的分子，但是其表达的强弱却有很大差别时，就应该用平均荧光强度来区分。

图 25-7A 中，作者需要检测 $CD4^+CD69^+$ 细胞表达 CD25 和 CD122 分子的情况，以 $CD4^+CD69^-$ 细胞作为对照，用散点图表示，因为有较为明显的阴阳性之分，所以用阳性比例来表示，从图 25-7 中可以看出，与 $CD4^+CD69^-$ 细胞相比 $CD4^+CD69^+$ 细胞表达更多的 CD25 和 CD122 表型分子。图 25-7C 中，作者需要检测 diffDC 的表型，以不成

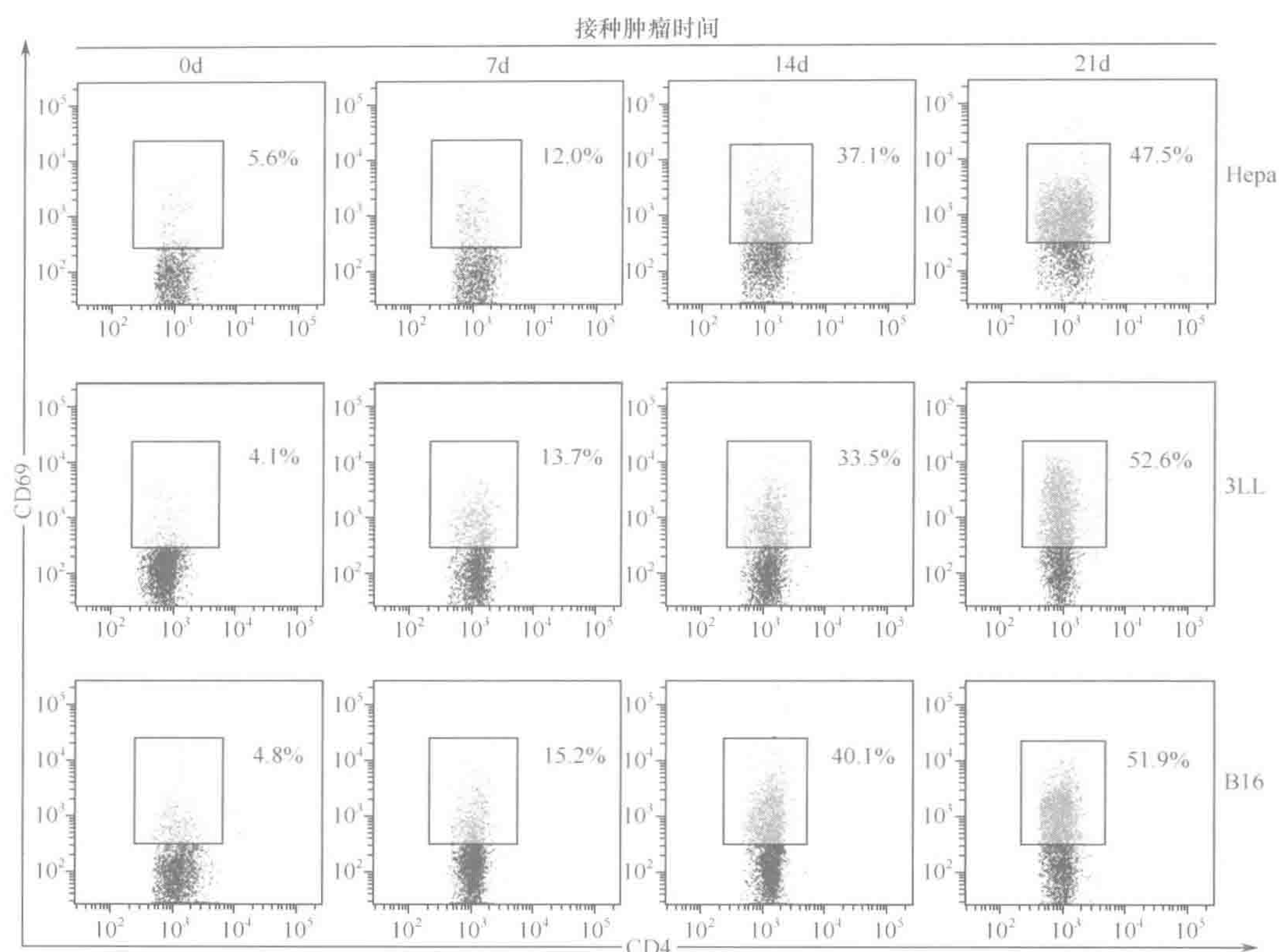


图 25-6　细胞亚群比例测定举例（Han et al.，2009）

熟 DC（imDC）和成熟 DC（maDC）作为对照，检测了Ⅱ类分子 Ia、CD80、CD86、CD106、CD11b、CD11c、CD40 等表型分子的表达情况，用直方图表示，各个直方图左侧虚线图为阴性对照，实线图为实验结果，因为有很多表型分子没有明显的阴阳性分群，所以统一用平均荧光强度来表示，图中的数字就是平均荧光强度。根据表型结果，diffDC 不同于不成熟 DC 也不同于成熟 DC。

有些表型分子表达于细胞内部，如以核酸为配体的 TLR 分子、调节性 T 细胞的关键转录因子 Foxp3 等。这时标记荧光偶联抗体就与标记表面分子时不同了，因为对于活细胞而言，荧光偶联抗体是不能穿过细胞膜进入细胞内部并与细胞内部的相应分子结合的。所以首先要用固定剂将细胞固定，常用的流式标记固定剂为多聚甲醛，但某些特殊的分子可能需要特殊的固定剂，如标记 Foxp3 时就不能使用一般的固定剂，它有专门的固定剂。固定之后用打孔剂在细胞膜上打孔，在打孔的同时加入荧光偶联抗体，这时荧光偶联抗体就可以进入到细胞内部与相应的抗原分子结合。固定的时间大约为 20min，打孔和标记的时间大约为 70min。此时需要注意两点：①细胞经过固定打孔后其物理特性将发生改变，细胞的大小和颗粒度将发生变化，反映在流式图上其 FSC 和 SSC 将发生变化，要注意区分；②细胞固定后就已经死亡，这时就不能用 7-AAD 等标记死细胞的荧光染料同时标记用于排除死细胞或者检测死细胞的比例。图 25-7B 表示的

是 $CD4^+CD69^+$ 细胞和作为对照的 $CD4^+CD69^-$ 细胞表达胞内转录因子 Foxp3 的散点图，说明新型调节性 T 细胞与经典的调节性 T 细胞不同，它不表达 Foxp3。

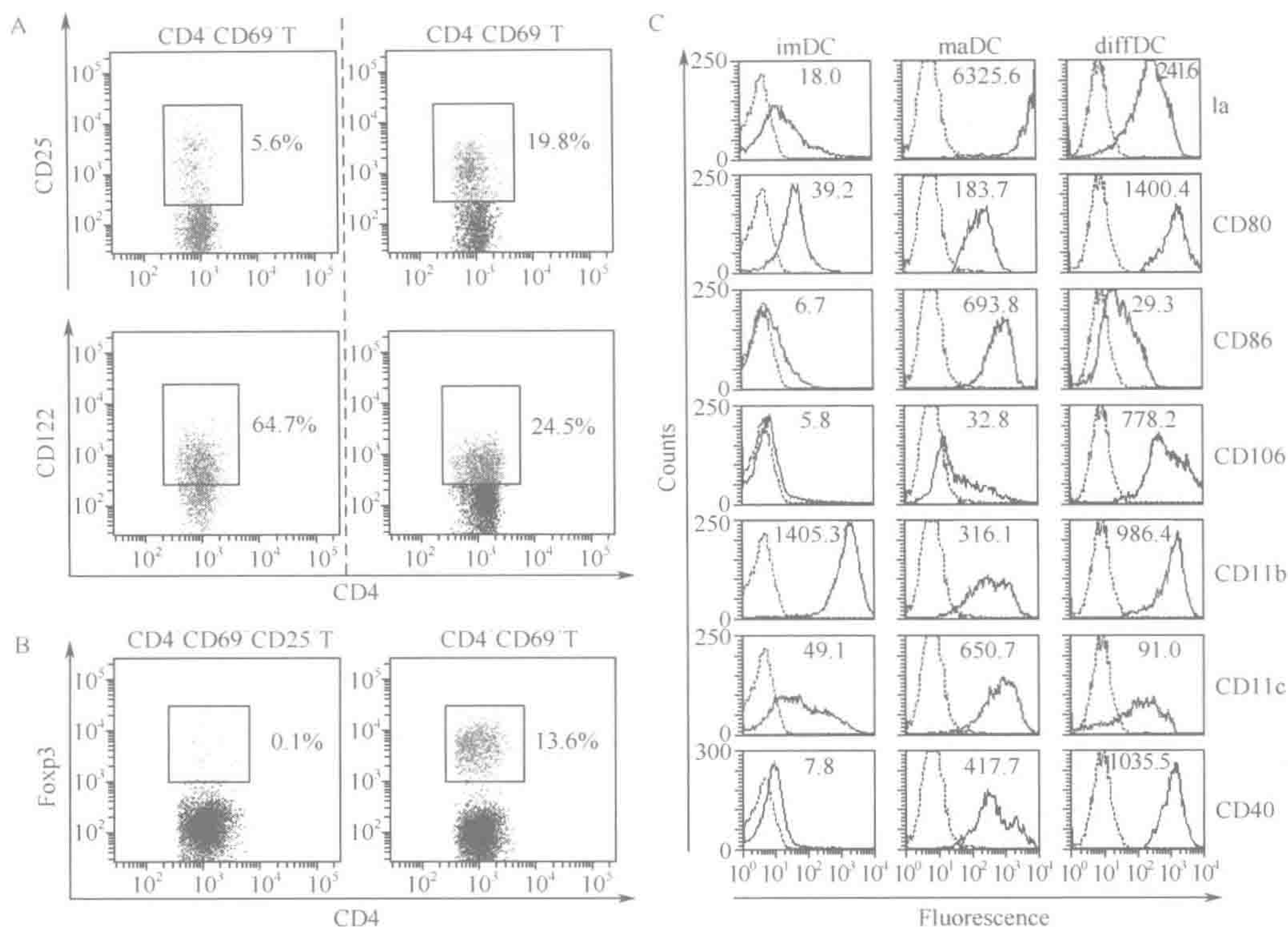


图 25-7　细胞表型测定举例

A、B. 细胞表型分析散点图（Han et al.，2009）；C. 细胞表型分析直方图（Zhang et al.，2004）

（三）细胞因子流式检测

免疫细胞的功能特点之一是能够分泌各种细胞因子，通过分泌的细胞因子发挥各种作用，所以检测细胞分泌的细胞因子对于研究细胞的功能非常重要。检测细胞因子的方法有很多，最常用的是 ELISA 法，而利用流式细胞仪检测细胞因子的方法主要有两种，即胞内染色法和 CBA 法。

1. 胞内染色法检测细胞因子

胞内染色法检测细胞因子的标记方法与检测细胞内表型分子的标记方法类似，简而言之，先标记表面分子，然后用固定剂固定细胞 20min，最后边打孔边标记荧光偶联细胞因子单抗 70min 后洗涤、上样分析。

与胞内表型分子不一样，细胞因子表达之后是持续分泌到细胞外的，所以检测时位于细胞内的细胞因子的量可能就非常少，达不到检测所需要的浓度。所以，在用胞内染色法检测细胞因子时，需要先用适当的刺激剂刺激细胞表达相应的细胞因子，如检测 T 细胞分泌的细胞因子时可以用离子酶素和 PMA 刺激；检测 B 细胞分泌的细胞因子时可

以用抗 CD40 单抗和抗 IgM 单抗等刺激。在刺激的同时用高尔基体阻断剂 BFA 抑制表达的细胞因子分泌到细胞外，从而使刺激后大量表达的细胞因子积聚在细胞内，达到检测时所需要的浓度。因为 BFA 对细胞有毒性作用，所以作用时间一般不超过 6h，超过 6h 可能会导致细胞死亡，而时间太短，会因积聚的细胞因子浓度不够而检测不到。

胞内染色法和 ELISA 法是检测细胞因子的两大方法，两者侧重点不同，各有优缺点，一般需要同时使用两种方法，两者互补就能较为全面地说明问题。ELISA 法检测细胞因子时需要将所研究的细胞纯化出来，加入刺激收上清液检测分泌到上清液中的细胞因子的浓度。因为是检测上清液中的细胞因子浓度，所以得到的结果反映的是整个细胞群平均分泌细胞因子的能力，而无法得到该群细胞中有多少比例的细胞分泌这种细胞因子，或者是该群细胞中的哪个亚群分泌细胞因子等信息。有时如果纯化的细胞纯度不高，混入的细胞分泌某种细胞因子的能力很强，就会将混入的细胞分泌的细胞因子当作是所要研究的细胞分泌的细胞因子。而胞内染色法检测细胞因子就可以克服这个缺点。它不需要纯化所要研究的细胞，只需要标记相应标志性分子在流式图上设门即可，同时还能得到分泌细胞因子的细胞占目标细胞的比例。而且，如果一群细胞同时分泌两种细胞因子，用 ELISA 法就不能区分是一个细胞能同时分泌两种细胞因子，还是一个细胞只能分泌其中一个细胞因子，而胞内染色法就可以加以区分，只要这两种细胞因子单抗偶联的荧光素处于不同检测通道即可，如用 FITC 偶联抗体标记一种细胞因子，用 PE 偶联抗体标记另外一种细胞因子。虽然胞内染色法有上述优点，但是它不能表示细胞分泌细胞因子能力的强弱，可能细胞表达某种细胞因子的比例相同，但是细胞表达细胞因子的能力就可能相差很多，这时就需要用 ELISA 法检测细胞表达细胞因子的能力强弱。所以检测某种细胞或者细胞亚群细胞因子的表达情况，最好同时使用 ELISA 法和胞内染色法。

图 25-8 引自 “Zhang”，作者需要检测成熟 DC 和 diffDC 在不加刺激和加 LPS 刺激的条件下分泌促 Th1 细胞因子 IL-12 和抑制性细胞因子 IL-10 的情况。作者用散点图表示，散点图显示的细胞就是成熟 DC 或者 diffDC，纵坐标表示细胞因子单抗偶联荧光素的荧光表达情况，位于横线上面的细胞均为分泌相应细胞因子的细胞。从图 25-8 中可以看出，成熟 DC 经 LPS 刺激后主要表达 IL-12，而不表达 IL-10，相反 diffDC 经 LPS 刺激后主要表达 IL-10，而不表达 IL-12，提示 diffDC 可能以抑制性功能为主，而不是成熟 DC 表现的促 Th1 反应的作用。

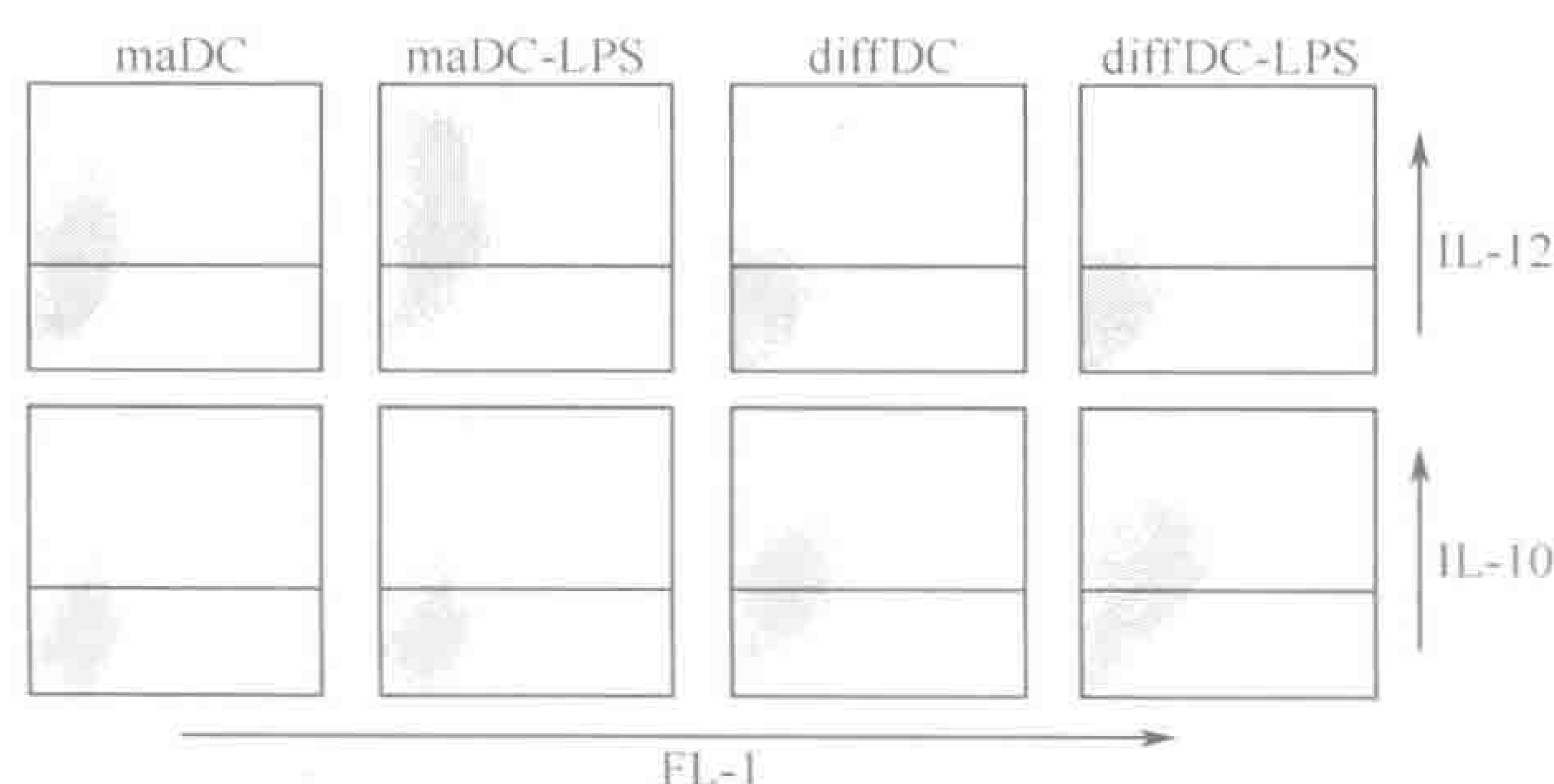


图 25-8　胞内染色法检测细胞因子举例

2. CBA 法检测细胞因子

CBA 是 cytometric bead array 的缩写。流式细胞术是基于细胞水平上的技术，一般来说，是不能检测可溶性蛋白质分子的，但是 CBA 技术利用人工微珠代替细胞，用微珠上结合的特异性抗体结合细胞因子，然后再加上 PE 偶联的细胞因子特异抗体，来相对定量检测液体中细胞因子的浓度。

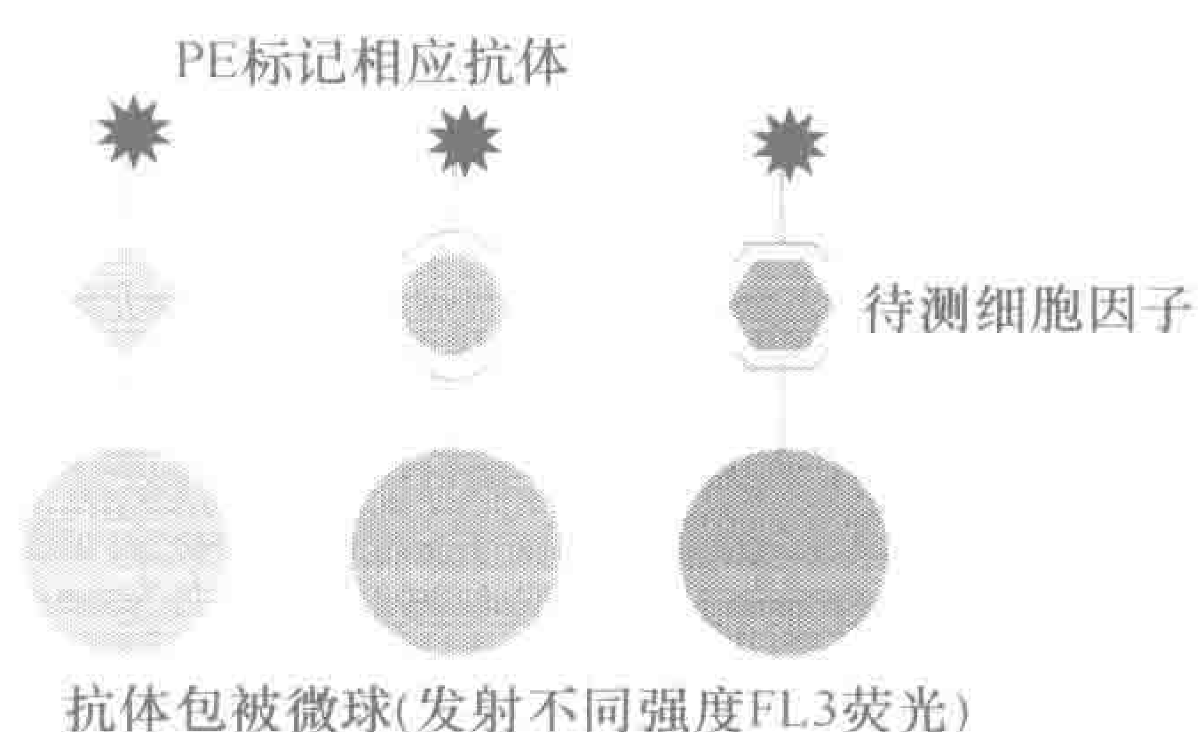


图 25-9　CBA 技术原理图

如图 25-9 所示，CBA 技术融合了芯片技术的理念，一次可以同时检测多个细胞因子。每一个微珠只结合一种针对某一个细胞因子的抗体，带有相同抗体的微珠其表面结合的荧光素量相同，带有不同抗体的微珠表面结合的荧光素量不同，而这些荧光素被 488nm 的激光激发后发射的荧光可以在第三通道被检测到。所以通过区分第三通道荧光强度的不同，可以将带有不同细胞因子单抗的微珠区分开，形成细胞因子各自的检测带。微珠与待测液体混合后，能够与液体中可溶性的相应的细胞因子结合，然后再加入 PE 偶联的细胞因子的抗体，通过检测微珠 PE 荧光的强度来反映待测液体中细胞因子的含量。

CBA 技术和 ELISA 技术都是用来检测液相中可溶性细胞因子的浓度，相对于 ELISA 技术而言，CBA 技术有 3 大优势：①ELISA 一次只能检测一种细胞因子的浓度，而 CBA 一次可以检测多种细胞因子的浓度，可以达到一次检测 6 种细胞因子，且检测一次需要的液体量比 ELISA 要少，尤其适用于检测少量细胞所分泌的细胞因子。②操作简单，CBA 只需两步标记，第一步微珠与待测液体混合，第二步再加 PE 偶联细胞因子抗体，洗涤一次即可上样分析，比 ELISA 简便，省时。③CBA 的敏感性要比 ELISA 法高，一般 CBA 可以检测几个 pg/ml，而 ELISA 最低只能检测到几十个 pg/ml 的浓度。

但是，CBA 在定量方面就不如 ELISA，CBA 虽然可以用特定的软件来定量液体中的细胞因子浓度，但是其准确性不如 ELISA，另外，CBA 试剂盒要比 ELISA 贵很多。

图 25-10 所示的是用 CBA 法测某原发性肝细胞癌患者血清中各 Ig 亚型浓度的流式图。左图是对照，右图是血清测得的流式图。从图 25-10 中可以看出，从上到下根据第三通道（PE-Cy5）荧光强度不同共有 7 个细胞带，分别代表 Ig 的 7 个亚型，从上到下分别为 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM 和 IgE。从图 25-10 中可以初步判断，血清中 IgG2b 浓度最高，IgG2a 和 IgM 次之，可能不存在其他 4 种亚型，进一步利用专门的分析软件就可以得出具体的浓度值。

（四）细胞增殖流式检测

检测细胞增殖，尤其是 $CD4^{+}$ T 细胞的增殖，是细胞免疫学的一个重要内容，如检测不同 T 细胞增殖能力的不同，检测抗原提呈细胞提呈的能力，加入免疫抑制细胞检

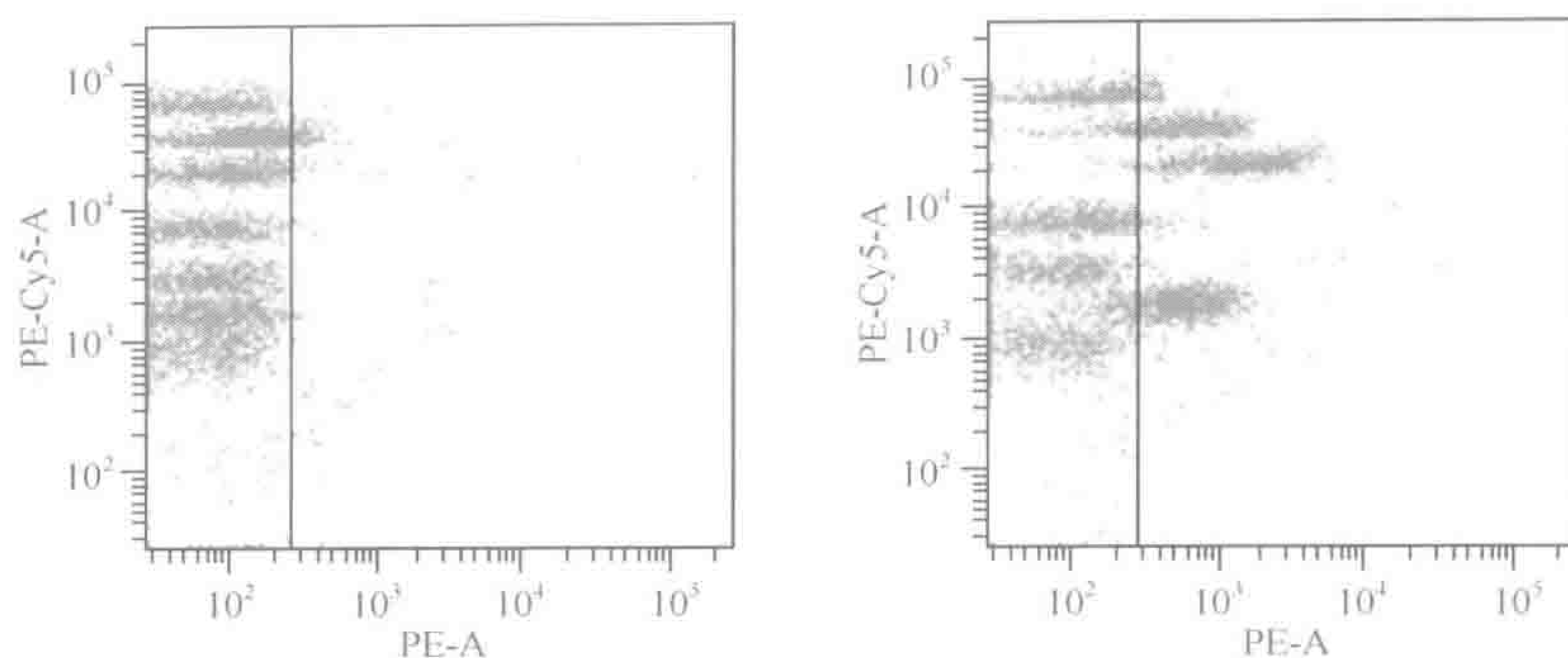


图 25-10　CBA 测细胞因子流式图

测其抑制免疫反应的能力等。

检测细胞增殖最经典的方法是^{3}H 掺入法，但是^{3}H 有放射性，并不安全，且操作不方便，而用流式细胞术检测细胞增殖，方法简单，安全可靠，已经逐渐普及。流式细胞术检测细胞增殖的方法主要有相对细胞计数法、CFSE 标记法和 Brdu 标记法 3 种。

1. 相对细胞计数法

相对细胞计数法是最为简单的利用流式细胞仪测细胞增殖的方法，以测 CD4$^+$ T 细胞增殖为例，只要将增殖反应后的各个对照孔、实验孔细胞收集后，标记荧光偶联抗 CD4 抗体，流式上样相同时间计数 CD4$^+$ T 细胞数即可。

此法虽然简单，但是需要注意以下几点：①需要设置复孔，每一个对照组或者实验组至少需要设置 3 个以上的孔，最后将得到细胞数平均即得到相对细胞数；②同一批实验各个对照组和实验组的条件必须一致，即必须保证将孔内所有细胞都收集到流式管内，保证最后上样时流式管内的液体量都是一致的，保证上样时细胞都稀释到相同倍数，从而保证最后的结果具有可比性；③必须在同一台流式细胞仪上不间断的同时上样，这样就能减少由机器所引起的系统误差，且上样的速度必须一致，同时计数的时间也必须相同。

图 25-11A 就是用相对细胞计数法检测 T 细胞增殖。图 25-11 中共分为 4 组，第一组只有初始 T 细胞和多肽，不会增殖，作为阴性对照；第二组加入成熟 DC，T 细胞增殖，作为阳性对照；第三组加入 CD69$^+$ 的调节性 T 细胞，T 细胞增殖明显减弱；第四组加入 CD4$^+$CD69$^-$ 对照细胞，不影响 T 细胞增殖。对相对细胞计数法得到的细胞数进行分析，就能得到实验结果。图 25-11C 也是用相对细胞计数法检测 T 细胞增殖。图 25-11 中从上到下分为 8 组，下面 4 组用的多肽为 NP，而初始 T 细胞都是 OVA17 肽特异性，而不是 NP 特异性，所以 T 细胞不会增殖，均作为阴性对照。第一组没有 DC 提呈多肽，T 细胞不会增殖；第二组加入成熟 DC，T 细胞明显增殖；第三组加入 diffDC，T 细胞增殖不明显，与第二组相比，说明 diffDC 基本没有提呈抗原给初始 T 细胞并刺激其增殖的能力；第四组同时加入成熟 DC 和 diffDC，T 细胞增殖同样不明显，说明 diffDC 能够抑制 T 细胞的增殖。

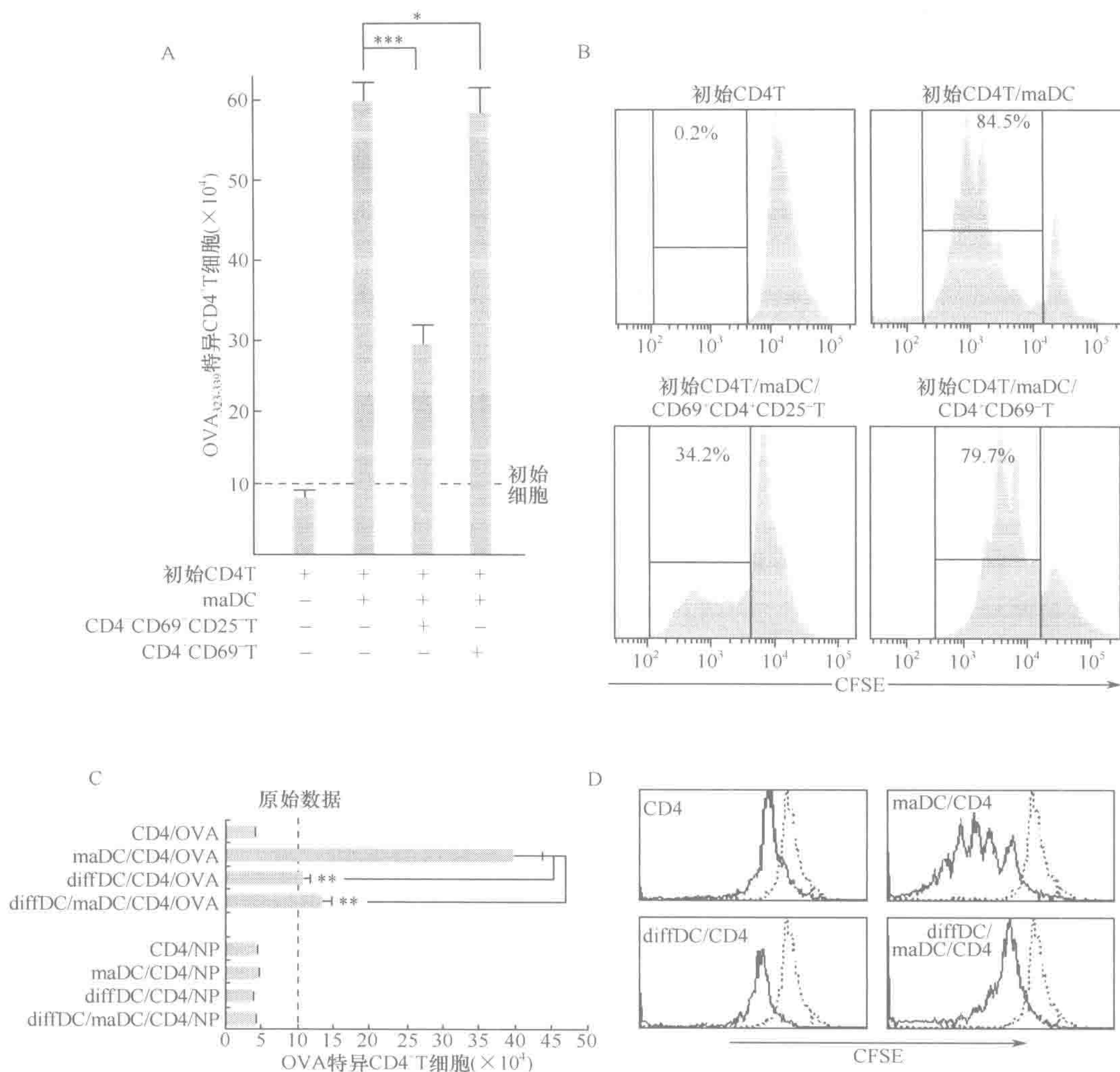


图 25-11 流式细胞术测细胞增殖举例（Han et al.，2009；Zhang et al.，2004）

A、C. CD4 T 细胞增殖的柱形图；B、D. CFSE 标记法检测 T 细胞增殖。* 差异不显著 $P>0.05$；** 差异显著 $P<0.05$；*** 差异显著 $P<0.001$

2. CFSE 标记法

CFSE 是一种化学荧光染料，它能够与细胞膜结合，而且结合紧密，即使长时间培养也不会脱落，所以可用于检测细胞增殖。在细胞增殖前将细胞标记上 CFSE，如将初始 T 细胞标记上 CFSE，流式上样时，CFSE 被 488nm 激光激发后能够在第一通道被检测到。细胞增殖是细胞分裂的结果，当标记有 CFSE 的 T 细胞分裂时，细胞膜上的 CFSE 会被平均分到两个子细胞上，这时分裂后的子细胞上的 CFSE 荧光强度只有母细胞的一半，当子细胞再分裂后，得到的第二代子细胞上的 CFSE 荧光就会减弱到 1/4。所以，当细胞增殖后，与未增殖细胞的 CFSE 荧光强度相比，弱于该荧光强度的 T 细

胞都是增殖后的 T 细胞，其比例越高，说明细胞增殖越多。

图 25-11B 与相对细胞计数法（图 25-11A）相对应，4 幅直方图显示的就是 4 组增殖后的 CFSE 图，第一幅阴性对照图中，可以看出因为 T 细胞在没有 DC 的情况下不会增殖，所以细胞的 CFSE 荧光都很强；而第二幅图 T 细胞在 DC 存在的情况下大量增殖，有 84.5%细胞的 CFSE 强度都小于最大值，说明都是增殖分裂后的 T 细胞；同理第三幅中因加入调节性 T 细胞抑制细胞增殖所以发生增殖的 T 细胞的比例只占到了 34.2%；而第四幅加入对照细胞不影响 T 细胞增殖。图 25-11D 与相对细胞计数法（图 25-11C）相对应，虚线为最初 CFSE 标记完后的荧光值，实线为增殖实验后的荧光值，从图中可以得出与图 25-11C 相同的结论。

标记 CFSE 染料时需要注意以下两点：①标记 CFSE 方法为在水浴 37℃标记 15min，标记时间过短，可能标不上，或者标上的 CFSE 很少，影响实验结果，而标记时间过长，CFSE 可能影响细胞活性。所以在标记 CFSE 时要摸索实验条件，选择最佳的标记浓度和标记时间；②标记后应马上将细胞置于冰浴中终止反应，并且用预冷的培养基洗 2 遍以上，保证洗去游离的 CFSE，否则实验体系中混有 CFSE 就会影响实验结果。

3. Brdu 标记法

Brdu 是一种人工半合成的核苷，在细胞复制时可以取代胸腺嘧啶核苷参加 DNA 的合成，掺入到细胞的 DNA 中，用荧光偶联的抗 Brdu 抗体标记，通过检测 Brdu 阳性细胞的比例间接检测细胞增殖的情况。

Brdu 标记法适用于体内检测细胞增殖的情况，可以掺入小鼠的饮水中或者腹腔注射 Brdu，一段时间后处死小鼠，取出目标细胞所在的脏器，制成单细胞悬液标记荧光偶联抗体，流式上样测得 Brdu 阳性细胞比例即可。

（五）细胞凋亡流式检测

细胞凋亡是指细胞在一定的生理或者病理条件下，主动地、有序地自己结束生命的过程。细胞凋亡是生物体中一种普遍存在的现象，个体发育、衰老细胞的清除等都与细胞凋亡密切相关。细胞凋亡在免疫学中也尤其重要，最典型的例子便是 T 细胞的分化发育，在胸腺中 95%以上的胸腺细胞都会因为能够与自身抗原结合而凋亡，避免产生的 T 细胞因能结合自身抗原产生自身免疫性疾病。

检测细胞凋亡的方法有很多，如镜下形态学观察、细胞 DNA 提取物的 DNA 梯状带电泳实验等，而利用流式细胞术检测细胞凋亡也有很多种方法，这里介绍一种最为常用的细胞凋亡流式检测的方法：Annexin V/PI 双色法。

在正常的活细胞上，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine，PS）位于细胞膜的内表面，当细胞凋亡时，细胞表面发生变化，位于细胞膜内表面的 PS 会转移到细胞膜的外表面。Annexin V 是一种对 PS 有高度亲和力的磷脂结合蛋白，所以当细胞凋亡时，Annexin V 就能与位于细胞膜外表面的 PS 结合，通过与 Annexin V 偶联的荧光素标记凋亡细胞。但是细胞坏死的时候，PS 也会转移到细胞膜外表面，也能被 Annexin V 标记，而无法区分细胞是凋亡还是坏死。PI 是能够与 DNA 结合的发射红光（第二通道接收）的荧光染料，活细胞与凋亡细胞细胞膜是完整的，PI 不能通过细胞膜进入细胞内，

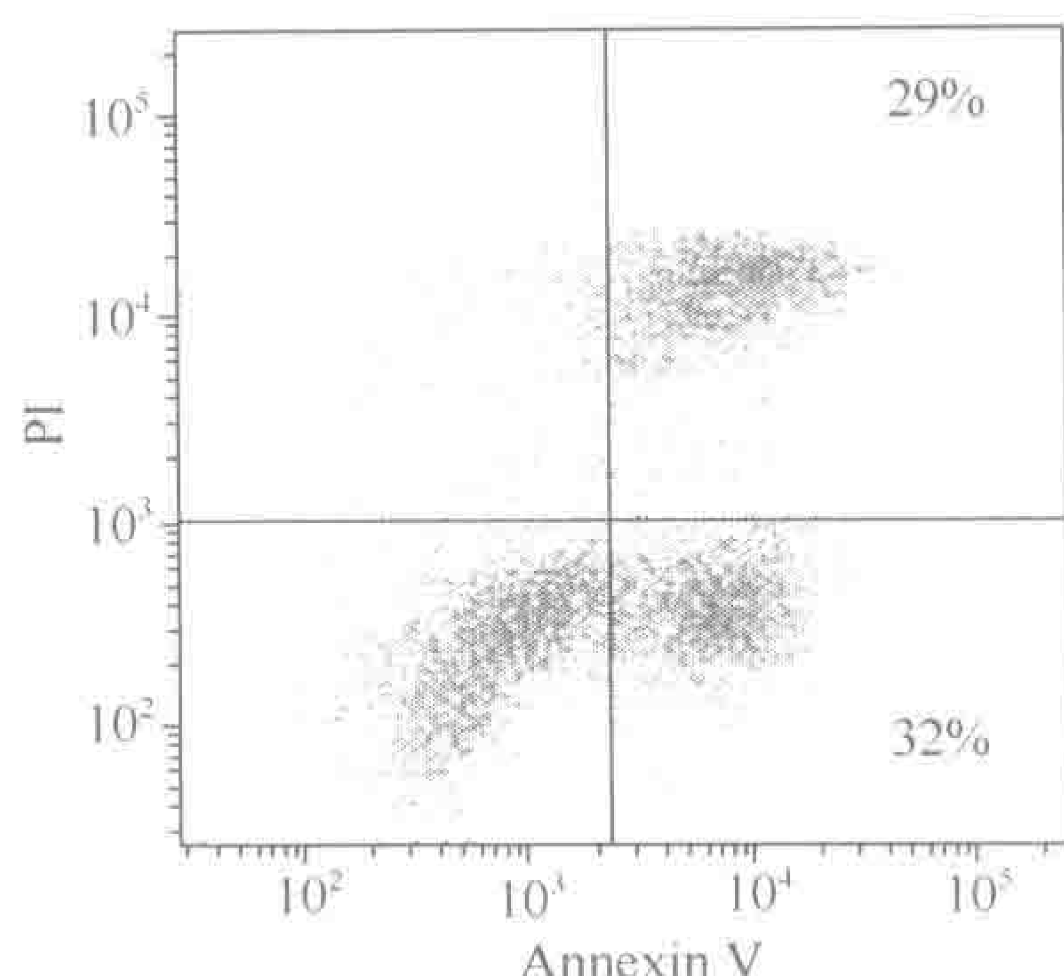


图 25-12　细胞凋亡流式图

因此是PI阴性的，而坏死细胞细胞膜的通透性增加，PI能够进入细胞内与DNA结合，所以坏死细胞是PI阳性的，因此可以用PI来区分凋亡细胞和坏死细胞。

图25-12是小鼠脾脏淋巴细胞经紫外线照射然后培养一段时间后标记Annexin V-FITC和PI的流式图。从图25-12中可以看出，检测的淋巴细胞中Annexin V阳性PI阴性的凋亡细胞占32%，Annexin V和PI双阳性的坏死细胞占29%，其余是活细胞。

（六）细胞周期流式检测

流式检测细胞周期是通过检测细胞DNA的含量来反映细胞处于哪个细胞周期来实现的。G_0期细胞是指细胞处于相对静止的时期，不参与增殖，所以细胞是二倍体，含有二倍体量的DNA；G_1期即DNA合成前期，此时DNA合成还没有开始，其DNA含量与G_0期相同，均为二倍体量；细胞进入S期后，DNA进行复制，其DNA含量位于二倍体和四倍体之间，是一个连续变化的过程；细胞进入G_2期后，DNA复制已经完成，此时为四倍体；最后进入M期，即有丝分裂期，在分裂之前，仍为四倍体。所以根据DNA量的不同，流式可以区分3个期，$G_{0/1}$期（二倍体）、S期（二倍体至四倍体）、G_2M期（四倍体）。通过检测细胞周期可以间接反映细胞增殖的情况，如果一群细胞处于S期和G_2M期的细胞比例越多，说明增殖越活跃。

流式细胞术检测DNA的含量一般选用PI荧光染料，细胞内DNA含量越多，结合的PI染料就越多，发射的荧光信号就越强，就可以指示细胞内DNA的量，从而推断细胞处于细胞周期的哪一个时期。图25-13A是将成熟DC与ESSC（脾脏来源基质细胞）共培养后DC的细胞周期图，图25-13B是成熟DC单独培养后的细胞周期图，图25-13A中处于S期（M3）和G_2M期（M2）细胞比例达到了25.3%，而图25-13B只有4.7%，说明在ESSC存在的条件下，成熟DC增殖活跃。

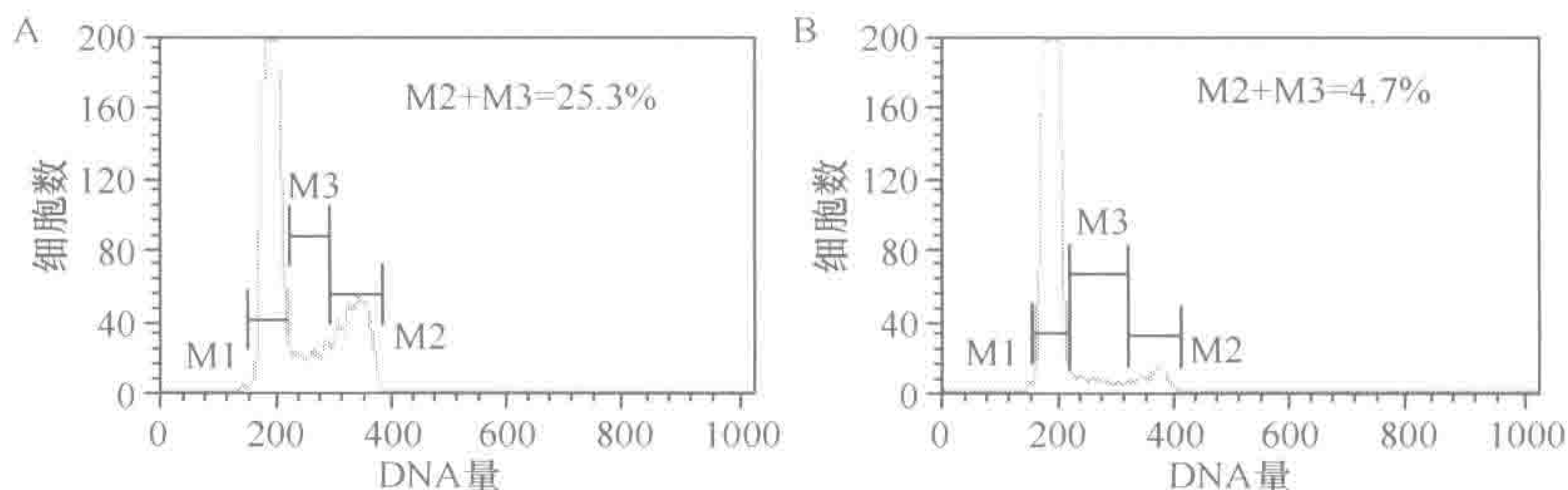


图 25-13　细胞周期流式检测举例（Zhang et al.，2004）

因为PI不能穿过活细胞的细胞膜进入到细胞内部与DNA结合，所以不能将活细胞直接用PI染色，应先用固定剂将细胞固定后再用PI染色，固定细胞可以选用70%的乙醇，常温作用20min即可。

值得注意的是，当细胞凋亡时，核酸广泛断裂，形成的小段DNA可能在固定、洗染的过程中经细胞膜逸出，因此细胞内的DNA含量可能少于二倍体量，这时在流式图上显示的位于二倍体峰前面的部分可能就是凋亡细胞。另外，有些细胞可能出现多倍体的现象，如肿瘤细胞，这时要设好对照，明确二倍体的位置，用于区分肿瘤细胞是几倍体。

（七）胞内磷酸化信号分子流式检测

细胞因子胞内信号通路的研究是分子免疫学的重要内容，胞内信号分子有很大一部分都是激酶，而这些激酶活化状态多数就是其磷酸化后的状态。检测胞内磷酸化的一些重要的信号分子对于细胞功能状态的提示，具体信号通路的状态等情况均有很好的提示作用。

传统检测磷酸化信号分子是用Western印迹法，将细胞破碎后提取蛋白质，然后用抗体检测是否含有相应的信号分子。Western印迹法步骤繁琐，对实验技术的要求比较高，而且需要较多的细胞，当研究少量细胞的磷酸化信号分子时有时很难达到Western印迹法要求的细胞数，另外，Western印迹法得到的细胞只能表示这群细胞中是否有磷酸化信号分子，以及其平均的相对量，但是不能反应这群细胞中是否所有细胞的该信号分子都已磷酸化或者含有磷酸化信号分子细胞的比例。而流式细胞术，磷酸化信号分子特异的荧光偶联单抗，就可以克服以上缺点。

流式细胞术检测磷酸化信号分子的方法与检测胞内表型分子的方法一致，在此不再赘述。

图25-14中，作者用磷酸化ERK1/2单抗（pT202/pY204）检测两群T细胞，发现实验组有58.9%的细胞表达磷酸化ERK1/2，而对照细胞只有12.6%表达，其平均荧光强度也明显高于对照组。说明ERK1/2通路对这群新型的抑制性T细胞的功能很重要。

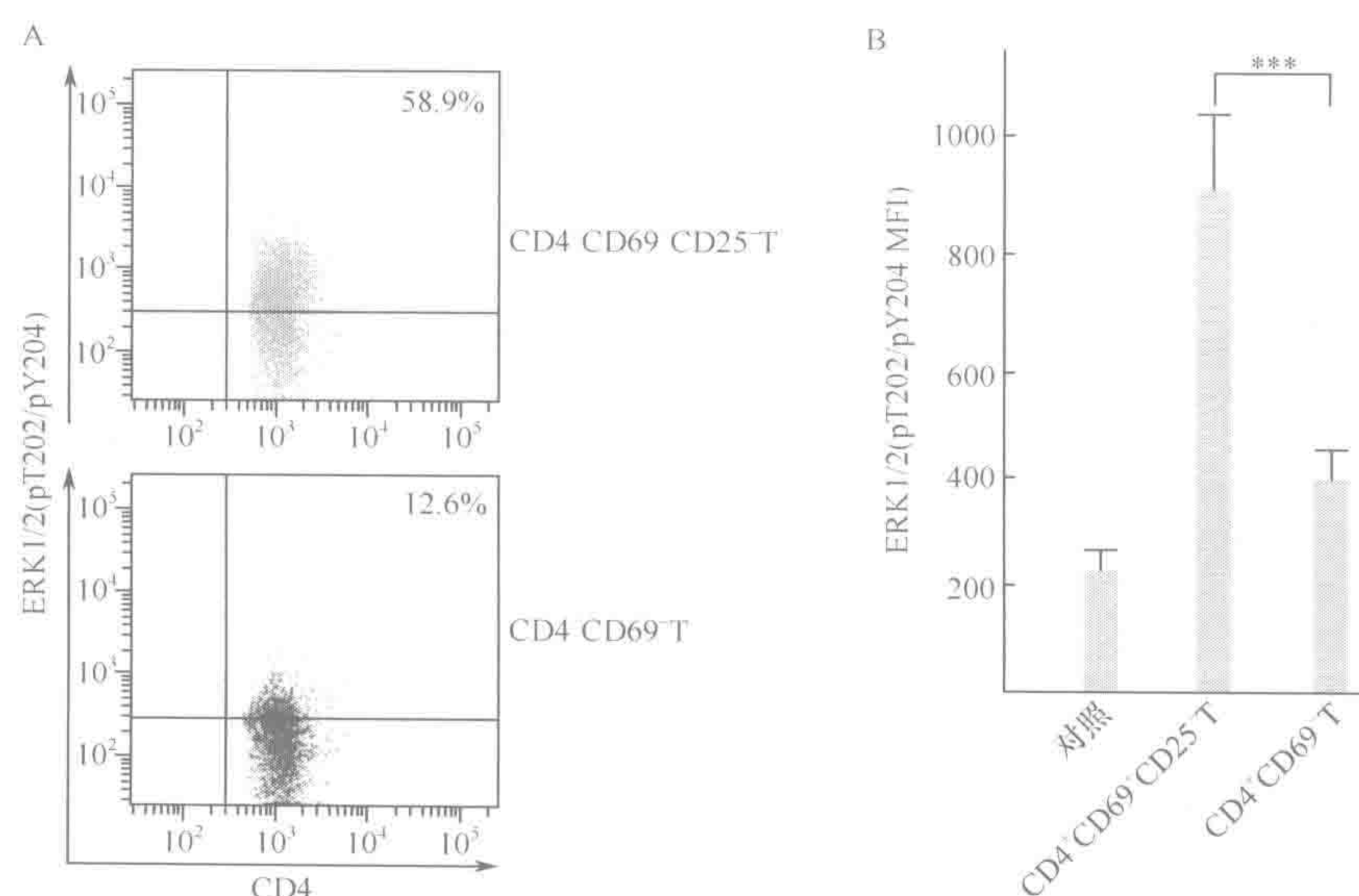


图25-14　流式检测胞内磷酸化信号分子举例（Han et al.，2009）
A. ERK 1/2（pT 202/pY204）表达的流式散点图；B. ERK 1/2（pT202/pY204）荧光强度柱形图。*** 显著差异（$P<0.001$）

第二节　流式分选

一、原理

（一）分选型流式细胞仪

目前流式细胞仪都已专业化，或者专门用于分析，或者专门用于分选。前述的分析型流式细胞仪就不能用于分选。虽然分选型流式细胞仪原则上可以用于分析，但由于该仪器上样管道通常较长，故用于分析需要花费太多时间，并且要求每一管样品均需过滤后方能上样，否则可能导致喷嘴堵塞。所以，一般不推荐用分选型流式细胞仪来分析细胞。

购买分选型流式细胞仪需要重点考虑以下几点：①分选速度，可以说分选速度是体现分选型流式细胞仪发展的指标之一，这与喷嘴每秒钟打点数关系密切，打点数越多，分选速度就越快。尤其是在分选比例较低的细胞时，分选速度越快，越能节省大量的时间，细胞经历分选的时间越短，细胞的活力就越好，否则可能因分选时间过长导致分选得到的细胞死亡。②机器的稳定性，一方面是光路的稳定性，目前分选型流式细胞仪除了 BD 有一款光路是固定的，不需要调节，其他仪器的光路都是不固定的，每次开机都需要调节光路，这样每次调节光路就需要花费很多时间的仪器就不是很好。另一方面更重要的就是液柱的稳定性，这对于分选是最重要的，液柱不稳定，就根本无法进行分选。③分选后细胞的活力，经分选的细胞都需要经过由高电压形成的磁场，这对细胞是一个不小的刺激，如果分选后细胞都不能存活，或者活性很差，分选也就失去了意义。④分选的纯度，影响纯度的因素有很多，仪器只是一个系统因素，一般仪器在这方面的差别不会很多。其他如目标细胞的比例、荧光强度、是否独立成群、分选速度、设门的方法等都会影响分选的纯度。

图 25-15（见书后彩图）所示的是 BD 公司和贝克曼公司的两款分选型流式细胞仪。



MoFlo XDP



BD FACSV antage SE

图 25-15　分选型流式细胞仪

（二）基本结构与原理

分选型流式细胞仪的基本结构与分析型流式细胞仪基本相似，只是多了一个分选系统。图 25-16（见书后彩图）显示的是分选的原理模式图。

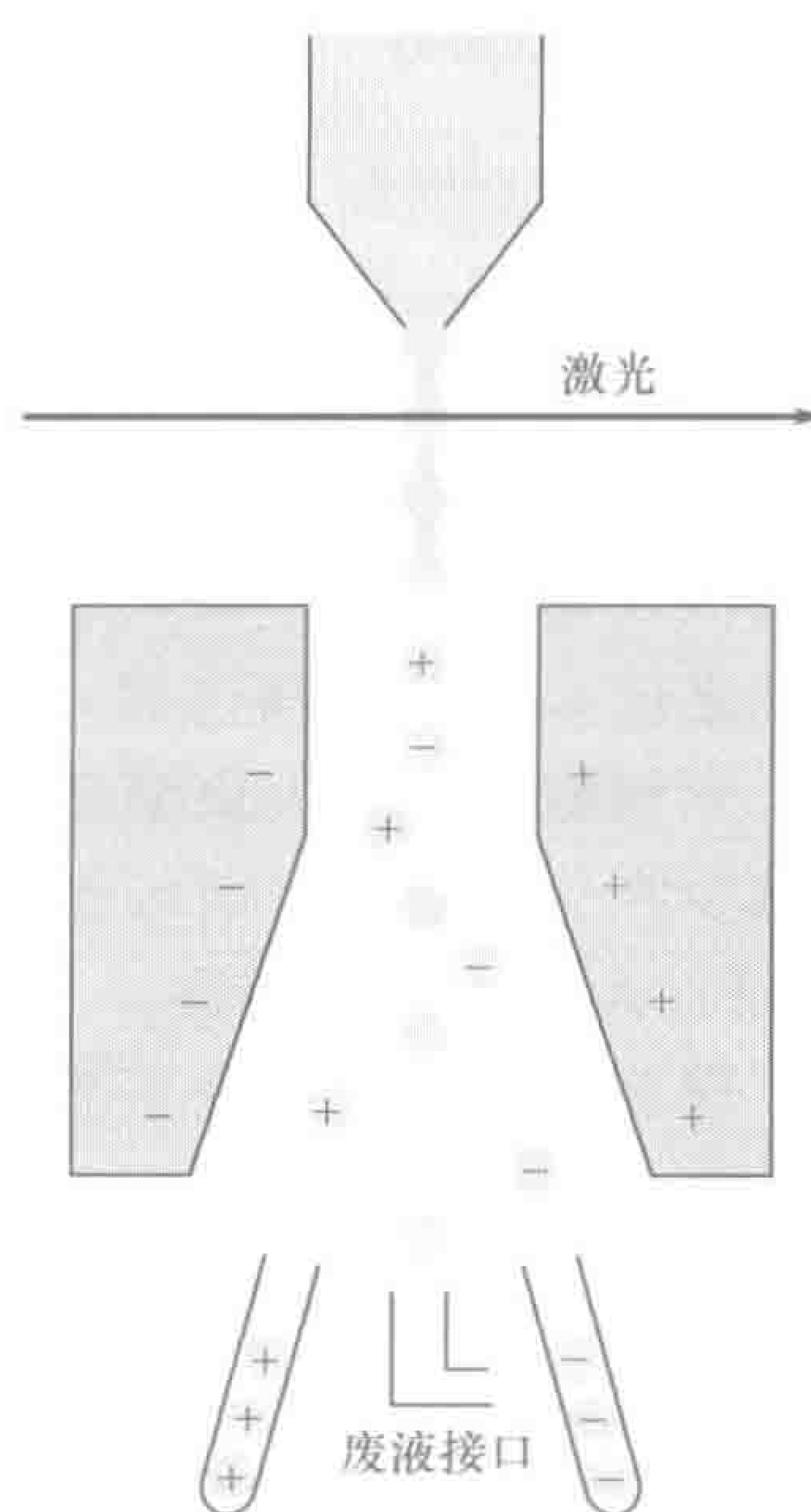


图 25-16　分选模式图

与分析型流式细胞仪不同，分选型流式细胞仪的液柱不是连续的，而是在经过喷嘴不久后形成一个个独立的液滴，这是由喷嘴高频振动引起的，称为“打点”。仪器每秒打点的数目与分选速度相关，仪器打点的稳定性关系到打点后液柱的稳定性，与分选纯度相关。以贝克曼公司的 Moflo XDP 为例，每秒能够打点 1×10^5 个，理想情况是每一个点（互不相连的小液滴）内刚好有一个细胞，则仪器一秒钟就能分析分选 1×10^5 个细胞，所以其最大的理想分选速度为 1×10^5 个细胞/s。

当一个细胞流经液柱时，先被激光激发，然后检测系统即可得到这个细胞的各个参数，判断这个细胞是不是目标细胞。如果是目标细胞，在一段时间后，即细胞到达从连续液柱进入到下一滴独立的液滴时，仪器给整个液柱通电，当包含这个细胞的液滴从液柱上脱落后，仪器结束通电，此时这个液滴就已带电，液滴在向下滴落时会经过由高压电（3000～4000V）形成的磁场，带电的液滴在磁场的作用下偏转离开原来的下落轨迹滴落到接收管中，就收集到了目标细胞。如果该细胞不是目标细胞，该细胞所在的液滴就不会带电，在磁场中便不会偏转，则经废液接口进入废液桶。以 Moflo XDP 为例，一次最多可以同时实现四路分选，即可以同时分选 4 种不同的细胞。这是通过液滴带电的正负性和所带的电荷量的多少不同来实现的，带正电的偏转到一边，带负电的偏转到另一边，带电量多的偏转角度大，带电量少的偏转角度小，便实现了四路分选。

从液滴被检测到其分选信息（包括是否需要被分选，哪一路分选）到细胞进入独立液滴需要通电的时间延迟是通过调节 dropdelay 值来实现的。一般情况下，在每次开机时都需要调节 dropdelay 值，其值与打点后液滴的形状相关。每次分选 dropdelay 值必须调节准确，否则纯度就无法保证。如 dropdelay 值大了一个液滴，仪器就会将分选信息实现在该细胞所在液滴的上一个液滴，这样，仪器分析一个细胞后本来应该对这个细胞的操作（是否带电，带什么电，带多少电）却作用到下一个细胞上，分选即失败。所以调节 dropdelay 值是非常重要的一个步骤，需要认真对待。

二、基本操作

（一）样品准备

样品的前期制备，即如何制成单细胞悬液和标记荧光偶联抗体的方法与流式分析样品 制备的方法一致，在此不做介绍。

由于分选型流式细胞仪上样管道较长，而且分选的时间比分析要长很多，所以细胞堵塞喷嘴的可能性就要大很多。一旦喷嘴堵塞就需要更换喷嘴，然后必须再调节光路，等待液柱稳定，所以流式分选首先需要考虑的事情是尽量避免喷嘴堵塞。因此，样品在上样之前必须经滤网过滤，要求滤网孔径不大于 40μm。滤网过滤可以去除大颗粒杂质、死细胞团块、大块细胞聚集物等，很大程度上减少了喷嘴堵塞的可能性。另外，为了减少在分选过程中因细胞死亡结块堵塞喷嘴，样品中最好加入血清保持细胞活力，加入 EDTA 减少细胞聚集。

样品的细胞浓度也是需要考虑的因素，浓度太高，在一定的分选速度控制下，上样管内液体流速减慢，增加堵塞喷嘴的可能性，同时细胞太浓，容易结团，也更容易堵塞喷嘴；浓度太低，液体量就多，增加分选的时间，影响细胞的活性。一般情况下，细胞浓度应控制在 $1\times10^7\sim5\times10^7$ 个/ml。但是不同的仪器之间可能会有差异，因此需多尝试以便得到最适细胞浓度。

（二）分选模式选择

流式细胞分选不是以细胞为单位进行分选的，而是以液滴为单位进行分选，由于细胞在液体中的分布并不是绝对均匀的，所以不能保证所有的细胞都绝对平均分布在所有的液滴中。所以，可能有的液滴中没有细胞，有的液滴中不止一个细胞。这时，就带来了一个问题，当一个液滴中部分细胞是目标细胞，部分细胞不是目标细胞，这个液滴是否需要分选出来呢？因此，流式分选根据分选目的不同提供了 3 种分选模式供选择。

1. 纯化模式

纯化（purity）模式是最常用的分选模式，当液滴中含有的所有细胞都是目标细胞时才收集该液滴，只要液滴中有一个细胞不是目标细胞，不管其中有多少目标细胞，都不要这个液滴。这样就能保证分选的纯度，即为纯化模式。一般情况下，单步分选一种细胞都会采用这个模式。

但是，选择了纯度，细胞的得率就会降低，因为那些虽然含有目标细胞，但因混杂有非目标细胞的液滴都没有被收集，导致很多目标细胞都没有收集到。所以在这个模式下为了保证细胞的得率，样品的细胞浓度就不能太高，保证总的细胞数少于总的液滴数，保证所有的细胞都有机会独自分配到一个液滴，同时，要经常振荡样品，使细胞尽量平均分布于样品中，减少两个或者两个以上的细胞共存于一个液滴的机会，这样就能提高分选的得率。

2. 富集模式

富集（enrich）模式是指将只要含有一个目标细胞的所有液滴都收集起来，不管这

个液滴中包含有多少非目标细胞，只要有目标细胞，便会被收集，所以，细胞的得率会很高，理论上可以将所有的目标细胞都收集起来。这时，样品的浓度影响的就不是得率，而是细胞的纯度，但是一般采用富集模式分选细胞，对纯度的要求就不会太高，所以，此时样品的浓度就可以高一点，分选的速度也可以适当提高，节省分选的时间。

一般富集模式用于比例较低的细胞分选，如比例低于1%的细胞分选，若直接用纯化模式，分到的纯度也不会很高，同时得率也很低。此时，先用富集模式富集目标细胞，然后再用纯化模式分选目标细胞，得到的纯度和得率都会提高。

3. 单细胞模式

单细胞（single）模式是指当液滴中只有一个细胞，而且这个细胞是目标细胞时才收集这个液滴，只要液滴不止一个细胞，即使其中所有的细胞都是目标细胞，也不会收集这个液滴。这时，就要求样品的浓度尽量低一些，保证每一个液滴内最多只有一个细胞，从而保证细胞的得率。

单细胞模式一般用于需要精确计数细胞数的实验，尤其适用于分选一个或者数个细胞于培养板的各个孔中时，如想得到其单克隆扩增时，就可以分选一个细胞到一个孔中，这时就可以选用单细胞模式进行分选。

（三）分选速度控制

分选速度即每秒被激光分析的细胞数，它由样品细胞的浓度和上样时液体流速决定，细胞上样分选时，细胞浓度一定，所以分选速度则由液体流速控制。而液体流速通过控制样品流和鞘液流压力差来控制，样品流压力越大，样品液柱就越宽，液体流速就越大。与分析型流式细胞仪不同，分选型流式细胞仪的压力可以连续变化，方便通过控制压力灵活控制分选速度。

控制分选速度，首先要了解仪器的最高分选速度，最高分选速度是由喷嘴打点的频率决定的。如果喷嘴每秒能够打点 1×10^5 个，那么理论上说，分选速度可以达到 1×10^5 个细胞/s，这是以打出的每个液滴刚好分到一个细胞的理想状态为基础的。但是在实际情况下，细胞不可能平均分到每一个液滴中，可能有的液滴中有两个以上的细胞，而有的液滴中则没有细胞。所以在实际分选中，最好不要用最高分选速度进行分选。

分选速度的控制除了与打点频率相关外，也因分选模式的不同而不同。如果选择的是富集模式，那么分选速度可以适当提高，因为不管液滴中有几个细胞，只要含有目标细胞该液滴都会被收集，分选速度可以提高到 8×10^4 个/s；如果选择的是纯化模式，分选速度一般不要超过 5×10^4 个/s，否则每秒 1×10^5 个液滴中分配到的细胞越多，一个液滴中存在两个以上细胞的可能性就会增加，目标细胞因与非目标细胞共存与同一液滴中而被排除的机会就会增加，细胞得率就会降低，但是如果样品量足够，对于得率的要求并不是很高时，也可适当提高分选速度；如果选择单细胞模式分选，分选速度就不要超过 3×10^4 个/s，样品的浓度也应适当降低，宁可液滴中没有细胞，也要降低两个细胞共存于一个液滴的机会。

总之，流式分选速度的控制应具体情况具体分析，没有一个固定的速度值供选择，

而应依据几个原则灵活的控制，根据分选模式的不同，在得率允许的条件下，尽可能提高分选速度，以节省分选时间，从而尽量保证细胞的活力。

（四）设门基本原则

所谓设门就是圈出需要分选出来的细胞的范围，一般来说，是先从 FSC-SSC 图中，根据细胞的大小和颗粒度圈出目标细胞所在的细胞群体，然后根据特定的荧光强度圈出所要分选的细胞。

设门是以细胞群体为基础的，并不是说随意在流式图中设一个门，最后分选出来的细胞都是在门内的。假如你设的门是一个细胞群体的一小部分，无论你设的门位于这群细胞的哪个部分，最后分选得到的细胞是整个细胞群体，而不是这个群体中位于门内的细胞。

一群各项参数或者说关注的参数相同的细胞，被流式细胞仪检测后并不是非常理想的都集中于这些参数所代表的流式图上的一个点，而是以这个点为中心，呈正态分布。因为当一个细胞经过激光的这个时间点，细胞并不是完全球形对称的，所以呈现的位置角度不同，得到的参数就有偏差，再加上细胞膜呈现动态流动的特征，细胞膜上结合的荧光抗体的分布也是不均匀的，所以即使细胞上面结合有相同的荧光抗体，最后检测到的结果也可能不同，根据概率分布，最后得到的结果就是正态分布。流式图中位于正态分布两侧的细胞，从结果来看右侧细胞的荧光强度应该强于左侧细胞，但是这只是检测值，实际情况可能是左侧细胞与右侧细胞表面结合的荧光偶联抗体的量是相同的，可能下次上样检测时，原本位于右侧的细胞就会位于左侧，原本位于左侧的细胞会位于右侧。所以，如果设右侧细胞为门，分选得到的细胞下次上样后可能会位于左侧，最后得到的细胞还是左右侧都存在的正态分布的一个细胞群体，而不是只有右侧细胞。

那么如何辨别细胞群体呢？在直方图上，一个理想的细胞群体呈正态分布，比较好辨别。在散点图中，细胞群体表现为以一个点为中心，或者一个小圆为中心，越向外圈细胞越少，呈放射状分布。流式分选设门应以细胞群体为基础。

如图 25-17 所示，要分选 CD3 阳性的细胞，CD3 阳性细胞明显是一个独立的细胞群体，与阴性细胞能够明显分开。左上图的设门是一个比较好的选择，右上图则是其分选后的细胞流式图，分选结果满意。如果根据左下图中的 1、2、3、4 或 5 来设门分选细胞，那么每一种设门分选后得到的结果都和右下图差不多，并不能得到与 1、2、3、4 或 5 设的门形状相同的细胞群体。

（五）死细胞去除方法

样品中混有或多或少的死细胞是不可避免的，所以在分选时应该尽量将死细胞排除在外，避免因死细胞的混杂而影响实验结果。在分选设门时排除死细胞的方法有以下几种可供选择。

1. 排除对角线细胞

死细胞产生的非特异荧光比活细胞要强，而且荧光强度呈现强弱不等的连续变化过程，从而与阳性的活细胞混在一起，有时难以完全区分。但是，死细胞有一个明显的特

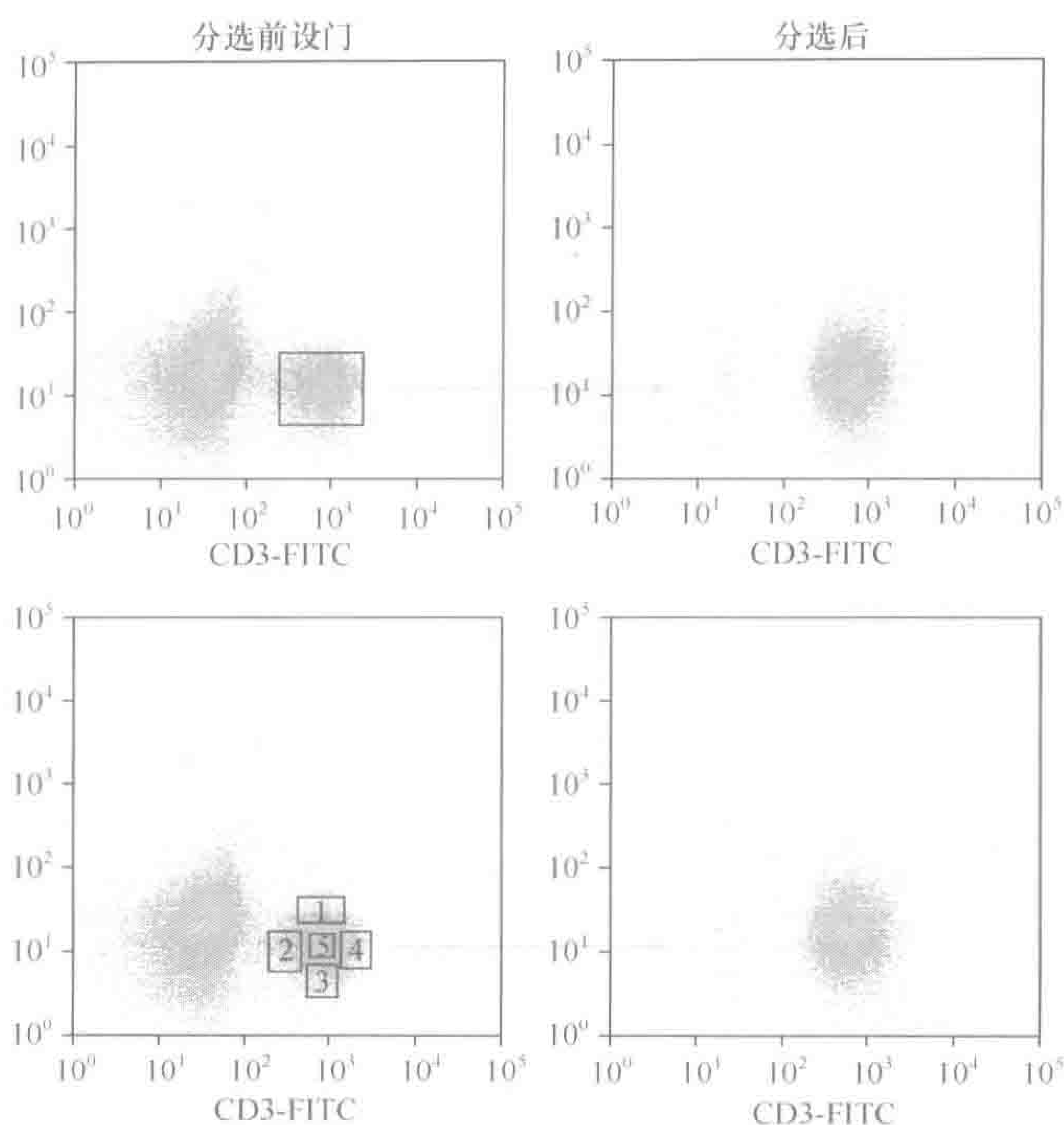


图 25-17　设门的基本原则

点，它各个通道的非特异荧光均比较强，而且一个特定的死细胞在各通道上的荧光强度差不多，表现在散点图上就是位于对角线上。一般情况下，散点图对角线上的细胞均认为是死细胞。

所以，利用死细胞的这个特点，设门时就可以排除死细胞。这时就要选用散点图，散点图的一个通道是不标记荧光偶联抗体的，另一个通道是标记荧光偶联抗体的，设门时圈上对角线以外的阳性细胞，就可以排除死细胞。

图 25-18 所示的是肝细胞癌患者肝癌组织浸润的淋巴细胞（混有死细胞和肿瘤细胞）散点图，只标记了 FITC 偶联的抗 CD3 单抗。如果用其他的图，很可能将 R1 和 R2 都归为 CD3 阳性的细胞，这群细胞没有标记 PE 偶联抗体，PE 通道上理论上应该没有阳性细胞，但是很明显的是 R2 这群细胞却表现为 FITC 和 PE 都阳性，但是 R2 细胞并不呈群体分布，而是相对严格的处于对角线上，形成狭长的条状，这就是比较典型的死细胞在散点图中的形状。所以用这种方法，将 R2 死细胞从 FITC 阳性细胞中排除，只分选 R1 就可以分选纯化目标细胞。

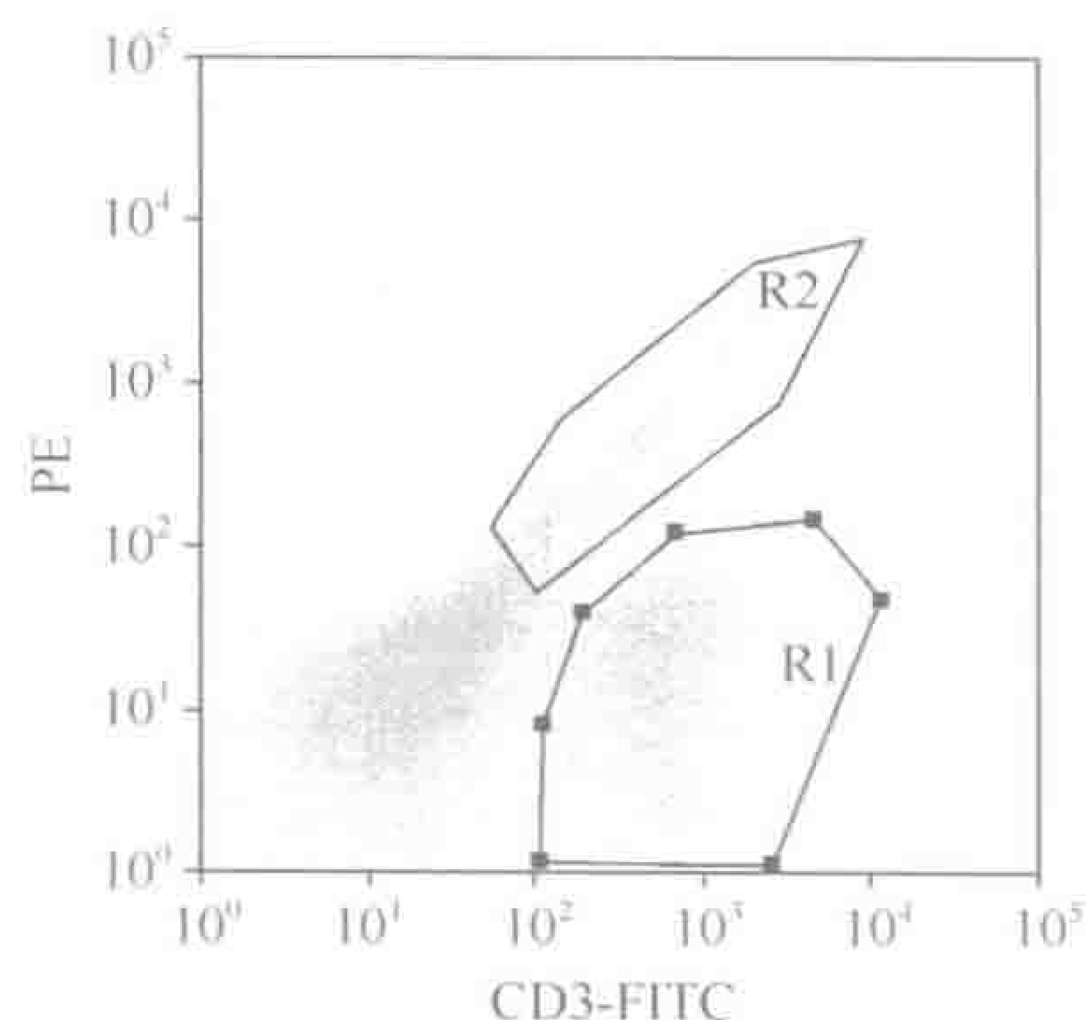


图 25-18　对角线法排除死细胞

2. 排除 Percp 通道非标记阳性细胞

在不标记 Percp 通道（一般为第三通道）荧光偶联抗体的情况下，死细胞位于该通道的阳性细胞位

置，且呈散在分布。所以，如果没有标记 Percp 通道，设门时只要将该通道阳性细胞排除在外，就可以尽可能地排除死细胞。

3. 7-AAD 标记死细胞

以上两种方法虽然比较实用，也比较简单，但是只是一种经验上的推测，当需要精确确定死细胞的位置，并将其排除在外时，可以标记 7-AAD，它可以特异性地标记死细胞，一般在第三通道接收到信号，只要将阳性细胞排除在外即可。

三、应用

（一）独立群体细胞分选

独立群体细胞分选是指所要分选的细胞在流式图上自成一个独立的群体，在荧光强度上与非目标细胞有一定的距离，有明显的界线。分选这种独立群体细胞是最常见的分选情况，也是最为理想的分选情况，分选得到的纯度和得率都最好。

要分选一群目标细胞，应该尽可能的选用荧光强度能够明显区分目标细胞与非目标细胞的荧光偶联抗体。一般情况下，第二通道（PE 通道）的荧光最强，在分选时尽可能选用 PE 标记的荧光偶联抗体，使目标细胞与非目标细胞明显分开，形成独立的细胞群体。

独立群体细胞分选的设门比较简单，一般先在 FSC-SSC 图中圈出目标细胞所在的细胞群，然后在相应的荧光通道散点图中圈出独立群体即可。设门的原则是圈中独立群体 90％的细胞，一方面使大部分细胞位于门内，保证得率；另一方面使设的门与非目标细胞距离尽可能的大，保证细胞的纯度。当然这只是一般原则，具体分选时应该根据实际情况灵活设门，如该独立群体荧光强度足够强，与非目标细胞距离足够远时，就可以圈 100％的细胞，提高得率。

（二）非独立细胞亚群分选

非独立细胞亚群分选是指目标细胞与非目标细胞在流式图上没有明显的界线，似两个独立群体紧密连在一起。这说明该荧光偶联抗体所代表的表面分子在表达上是一个连续变化的过程，可能并没有阴阳性之分，只是在表达上有所差异。这种情况也是经常出现，并不是每一次分选都能达到独立细胞群体分选的要求。

由于细胞群体的荧光强度呈现正态分布，散点图上的某个点所代表的荧光信息可能与这个细胞的真实情况有差异。所以，在设门时，针对阴阳性细胞或者说目标细胞与非目标细胞连续分布的情况，不能简单地从中间划一条线，将线上的设门为阳性细胞，将线下的设门为阴性细胞，因为可能线上的细胞其真实荧光强度是位于线下，而线下的细胞其真实荧光强度可能是位于线上，所以分到的细胞很可能有很大一部分是重叠在一起的。

图 25-19 所示的就是在分选非独立细胞亚群时两种设门方法分选后的结果。目的是要分选感染模型小鼠脾脏内 $CD11c^{+}CD8^{+}$ 细胞（目标细胞）和 $CD11c^{-}CD8^{+}$ 细胞（对照细胞）。如果根据图 25-19A 所示的设门，只是单纯的以阴阳性为界，

线上的都设门为双阳性细胞，线下的都设门为单阳性细胞，如图 25-19B 和图 25-19C 所示，分选后双阳性细胞和单阳性细胞有很大一部分重叠，没有达到分选纯化的目的。如果根据图 25-19D所示的设门，双阳性门和单阳性门相隔一定距离，排除中间细胞，如图 25-19E 和图 25-19F 所示，分选后得到的双阳性细胞和单阳性细胞没有明显的重叠，分选结果符合要求，当然，根据这种设门方法分选，分到的细胞要比前面一种要少。

所以，非独立细胞亚群分选时，分选阴性和阳性细胞的门应该互相远离，减少假信号细胞的渗入影响细胞的纯度。这个距离要求多远就应视具体情况而定，距离越远，纯度越高，但分到的细胞就越少，距离越近，分到的细胞多，但是纯度可能会下降。另外，还要根据流式图上的具体细胞形状而定，一般细胞呈狭长形的，距离可以近一些，细胞呈矮胖型的，距离应该远一些。

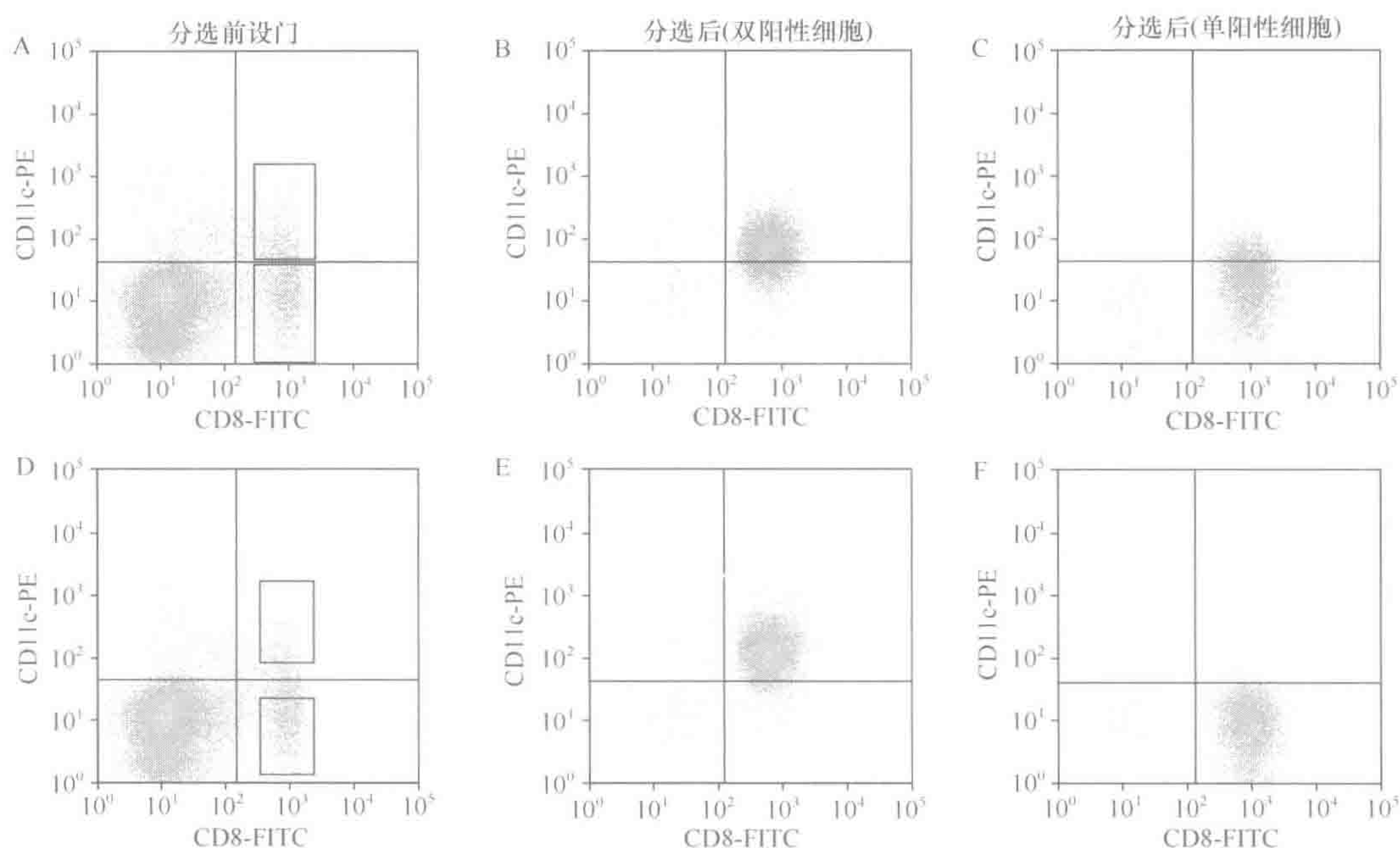


图 25-19　非独立细胞亚群分选设门

A、D. 分选前流式散点图；B、C、E、F. 分选后流式散点图

（三）SP 侧群细胞分选

干细胞是指具有自我更新能力和分化潜能的细胞，所有体细胞都来源于干细胞，对于成体来说，各个组织器官细胞的更新都需要各自的干细胞。目前，干细胞已经在临床上用来治疗疾病。干细胞的研究一直是热点，研究干细胞的关键之一是如何纯化干细胞。但是由于干细胞比例低，没有很好的表面标志，所以分选纯化干细胞一直是一个难题。

后来，用 DNA 染料 Hoechst33342 标记细胞时发现了一群染色较低的独特细胞，

称为 SP 侧群细胞，进一步研究发现，这群 SP 细胞富含干细胞，因此分选 SP 侧群细胞逐渐发展成为一种分选干细胞的经典方法。

Hoechst33342 是一种 DNA 化学染料，它是一种亲脂性物质，可以通过活细胞的细胞膜，所以不需要固定，可以染活细胞。而干细胞能够较为有效地将进入细胞内的 Hoechst33342 染料泵出细胞外，所以与非干细胞相比，其染色较低。在 Hoechst 蓝和 Hoechst 红散点图中，着染 Hoechst33342 染料的细胞呈现“鹰头”图形，而 SP 细胞就是其中的鹰嘴部分（图 25-20A）。标记 Hoechst33342 时，设一个对照管加入 Ca^{2+} 阻断剂维拉帕米，阻断干细胞将 Hoechst33342 泵出细胞外，流式图上就没有染色较低的 SP 细胞群。如图 25-20 所示，加维拉帕米组与不加维拉帕米组相比较，加维拉帕米组不存在而不加维拉帕米组存在的鹰嘴形状的细胞群就是 SP 侧群细胞，将这群细胞设门就可分选侧群干细胞。

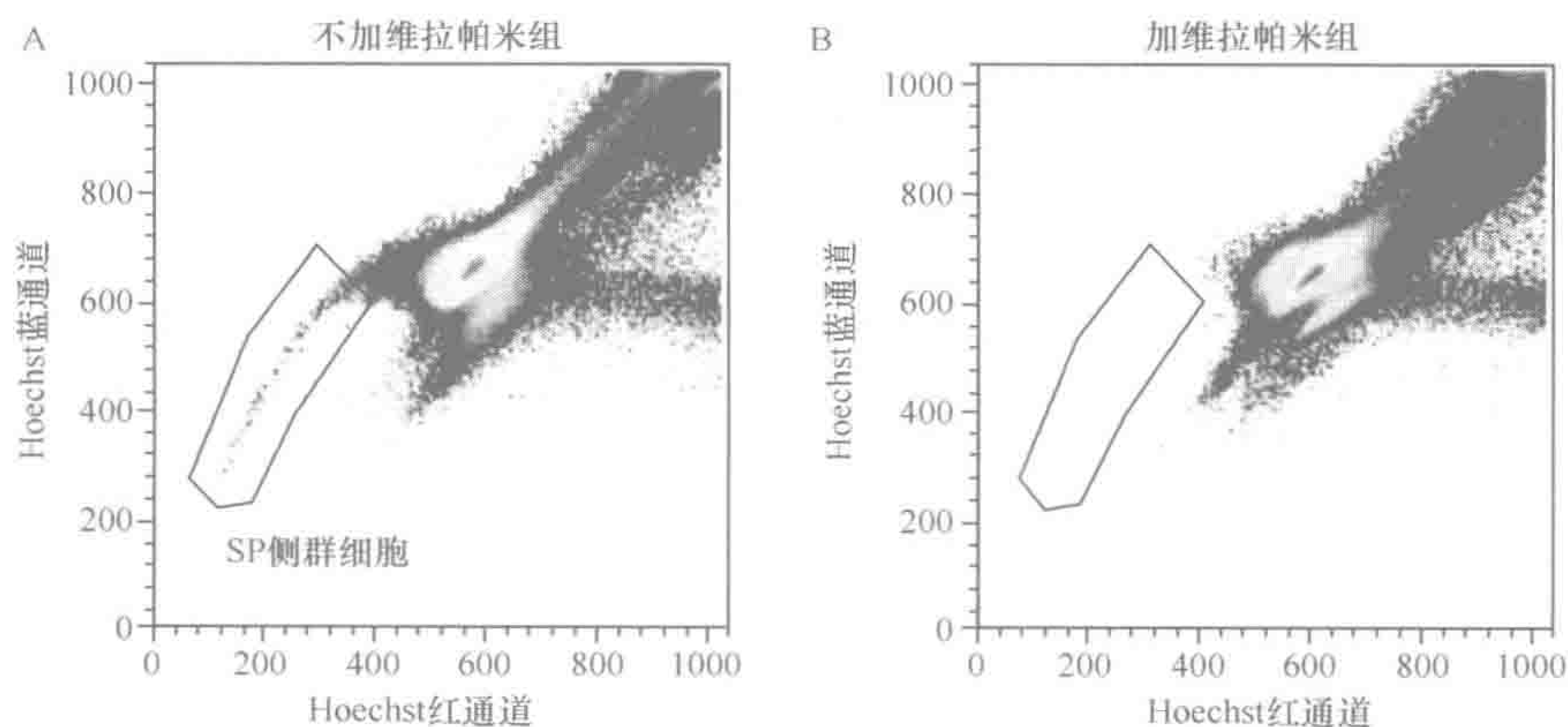


图 25-20　SP 侧群细胞流式图

标记 Hoechst33342 时应将细胞浓度严格控制在 1×10^6 个/ml，而且应预热到 37℃。然后加入 Hoechst33342，浓度为 5μg/ml，在 37℃标记 90min。然后马上置于冰浴中终止染色，用预冷的缓冲液洗 2 遍，上样前加入 5μg/ml 的 PI 用于去除死细胞，对照组加维拉帕米。检测和分选 SP 侧群细胞需用 405nm 紫外激光器，接收带通滤片 450/65 过滤后的光的通道为 Hoechst 蓝通道，接收带通滤片 670/30 过滤后的光的通道为 Hoechst 红通道，以红通道为 x 轴，蓝通道为 y 轴，数轴以长度形式表示，将去除死细胞后的细胞显示在此散点图上，以加维拉帕米组为对照，就可以检测和分选 SP 侧群干细胞。

（四）流式分选结合磁珠纯化

目前，纯化细胞主要有两种方法，即流式分选和磁珠纯化。磁珠纯化即用结合有磁珠的单克隆抗体标记细胞，当细胞流经柱子后使带有磁珠的目标细胞因磁性留在柱子上达到分离纯化的目的。

与流式分选相比，磁珠纯化方法简单，成本低，而且对细胞活性的影响也较低。但

是，磁珠纯化一般适用于细胞比例较高的细胞纯化，至少应该达到10%以上，用磁珠纯化可以达到较高的纯度，不适用于纯化比例较低的细胞。而且，磁珠纯化一般只能进行单色纯化，即一般只能根据一个指标纯化阳性或者阴性的细胞，而不能根据两个或者多个指标纯化细胞，也不能根据细胞的大小和颗粒度纯化细胞。另外，磁珠纯化一般只能纯化高表达细胞，当需要纯化低表达细胞时则不适用。

流式分选和磁珠纯化各有优缺点，可以将两种方法结合起来使用，以达到最优的分选方案。例如，要纯化正常小鼠脾脏 $CD4^+CD25^+$ 双阳性调节性 T 细胞，就可以采用磁珠纯化和流式分选相结合的方法。先用磁珠纯化的方法纯化 CD4 阳性的细胞，然后再标记抗 CD4 和抗 CD25 荧光偶联抗体，分选调节性 T 细胞。这种方法有以下几个优点：①先用磁珠纯化，就可以尽量去除样品中的杂质和死细胞，减少堵塞喷嘴的可能性；②纯化后得到的细胞再分选，目标细胞的比例提高，非目标细胞种类和比例减少，分选得到的细胞纯度和得率都会提高；③可以节省大量的分选时间，提高细胞的活性，节省时间对于分选一个脾脏可能并不明显，因为磁珠纯化细胞也需要时间，但是当分选两个或者多个脾脏时，就可以节省大量的时间，尤其对于分选速度较慢的分选型流式细胞仪，这种方法可以节省的时间就应该是首先要考虑的因素。

（五）二次法分选低比例细胞亚群

当细胞的比例低于1%，尤其是在这种低比例细胞亚群与某一高比例细胞群体在流式图上距离较近时，单次用纯化模式分选这种细胞的纯度和得率都会比较低。此时就可以用二次法分选这种低比例的细胞亚群。第一步，用富集模式分选目标细胞，这时设门的范围可以适当扩大，尽可能将所有目标细胞都富集起来，同时可以适当提高分选速度，减少分选的时间。第二步，将分选得到的细胞再次分选，此时目标细胞在样品中的比例就会很高，用纯化模式分选得到的细胞的纯度和得率都会较高。

当然，应用二次法分选，细胞要经历两次通电过程，需要两次经过高电场区域，势必会影响细胞的活性。所以，二次法分选适用于细胞活性较好的细胞。另外，如果可以用磁珠纯化的方法先富集目标细胞的尽量用磁珠纯化的方法，这样可以减小由二次法分选引起的对细胞活性的影响。

（韩岩梅　陈朱波）

参 考 文 献

Han Y, Guo Q, Zhang M, et al. 2009. $CD69^+CD4^+CD25^-$ T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-β1. J Immunol, 182: 111～120.

Imai N, Hishikawa K, Marumo T, et al. 2007. Inhibition of histone deacetylase activates side population cells in kidney and partially reverses chronic renal injury. Stem Cells, 25: 2469～2475.

Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary $CD4^+$ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. Nat Immunol, 8(4): 369～377.

Veldhoen M, Uyttenhove C, Snick JV, et al. 2008. Transforming growth factor-β 'reprograms' the differentiation of T

helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. Nat Immunol, 9(12): 1341～1346.

Wan H, Yuan M, Simpson C, et al. 2007. Stem/Progenitor cell-like properties of desmoglein 3^{dim} cells in primary and immortalized keratinocyte lines. Stem Cells, 25: 1286～1297.

Zhang M, Tang H, Guo Z, et al. 2004. Splenic stroma drives mature dentritic cells to differentiate into regulatory dentritic cells. Nat Immunol, 5(11): 1124～1133.

第二十六章　细胞凋亡和细胞周期的检测

细胞凋亡（apoptosis）一词来源于希腊语，原指花瓣、叶片的脱落。自 1972 年 Kerr 首次提出细胞凋亡的概念以来，随着细胞生物学、免疫学和肿瘤学研究的进展，最近几年人们对细胞凋亡的重大理论意义和实际意义有了更深的理解。细胞凋亡是指在一定的生理和病理情况下，机体为维护内环境的稳定，通过基因调控而使细胞自动消亡的过程。凋亡是机体自己启动，由细胞本身主动控制，由基因指导的细胞自我消亡过程。因此，又称程序性细胞死亡（programmed cell death，PCD）。不同类型的细胞，在发生凋亡时的动力学过程也不一致，存在着一定的形态学和生物化学的差异，但若干基本变化是大同小异的。凋亡细胞散在分布于组织中，形成的凋亡小体，除核裂解外，外有膜包绕，内有完整的细胞器，凋亡小体在组织中很快被邻近组织细胞吞噬，并在溶酶体中被降解。因此，凋亡不引起周围组织炎症及损伤。

细胞凋亡的检测有定性或定量两类方法。定性可以通过形态学观察，包括普通光学显微镜、荧光显微镜和电子显微镜等，也可以通过琼脂糖凝胶电泳来检测特征性 DNA 梯形条带。相比荧光显微镜，激光共聚焦技术提供了更高的分辨率，并可以做一定程度的断层扫描，利用相应的软件可以把图像压缩成三维立体图形。荧光显微镜和（或）激光共聚焦与定时摄影技术相配合，可以记录凋亡过程的动态变化。定量研究的首选方法为流式细胞仪。原位末端标记法则既可用于定性，又可用于半定量。

第一节　细胞凋亡的形态学检测

根据形态学变化过程，可将细胞凋亡分为 3 个阶段：①凋亡开始时，细胞表面的特化结构（如微绒毛、细胞突起及细胞表面的褶皱）消失，但细胞膜依然完整，没有失去选择通透性；线粒体大体保持完整，但是偶尔也见到线粒体变大，嵴增多；内质网囊腔膨胀扩大；细胞骨架的结构有时变得致密和紊乱；染色质浓缩分布在核膜周围或一侧，呈眼球状。②形成凋亡小体（apoptotic body）。产生凋亡小体有两种方式，一种为发芽脱落机制，首先染色体断裂为大小不等的片段，然后通过发芽起泡，与一些细胞器聚集在一起，形成一球形的突起，形成凋亡小体。另一种为自噬体形成机制，凋亡细胞内线粒体、内质网等和一些细胞内的胞质成分一起被内质网膜包裹，再与细胞膜融合后，形成凋亡小体。③凋亡小体形成后，被巨噬细胞或者邻近的细胞吞噬消化，此过程不影响其他细胞的生理功能，也不引起周围细胞的炎症反应。

对细胞凋亡的研究早期主要依赖光学显微镜和电子显微镜进行形态学观察。普通光镜主要是对染色的细胞涂片或组织切片进行观察，在镜下可见染色体核浓缩等，但其提供的信息有限，缺乏较为特征的指标，并具有较强的主观性，重复性差，现已不常用。

而电子显微镜的分辨率高，可以显示细胞各个亚器官的变化。荧光显微镜既可定位，又可做定量分析，因而更常用。

一、光镜

普通的光学显微镜可以观察到凋亡细胞区别于正常细胞的一些形态特点。

未染色细胞

凋亡细胞的体积变小、细胞变形，细胞膜虽完整但出现发泡现象，细胞凋亡的晚期可见到凋亡小体。贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落。利用相差显微镜，在高倍下观察可见凋亡细胞膜的泡化及细胞膜和核膜的折光性改变，但这些改变不是普遍现象。

染色细胞

细胞涂片或组织石蜡切片可作苏木素-伊红（HE）染色、吉姆萨（Giemsa）染色、瑞氏染色等，在高倍物镜下观察凋亡细胞的形态改变，结合显微测量工具可作凋亡细胞计数。凋亡细胞的主要特征为核染色质致密深染，形成致密质块，边缘化，核膜裂解，染色质分割成块状，有时可碎裂。在 HE 染色的组织切片中细胞体积缩小，胞质致密，嗜酸性染色增强，并可形成凋亡小体。凋亡细胞常在组织中呈单个散在分布，与周围细胞分离，不引起炎症反应。

用光学显微镜观察细胞的凋亡虽然方法简便直观，并可保存标本，但在细胞密集的组织中对于改变不典型的细胞判断较困难，常缺乏特征性的指标，故只是用于凋亡现象的初步观察，作为辅助分析的指标之一。

二、荧光显微镜和共聚焦激光显微镜

荧光显微镜观察细胞前需要用荧光染料对细胞进行标记，荧光染料对活细胞、凋亡细胞和坏死细胞可显示不同的颜色，显示凋亡时细胞核的形态特征。一般以细胞核染色质的形态学改变为指标来评判细胞凋亡的进展情况。此种方法比较简单，操作性也比较强。常用的荧光染料有吖啶橙、碘化丙啶（PI）、溴化乙锭（EB）、HO 33342（Hoechst 33342）、HO 33258（Hoechst 33258）、DAPI 等，HO 33342、HO 33258、DAPI 是 DNA 特异性染料。3 种染料与 DNA 的结合是非嵌入式的，主要结合在 DNA 的 A-T 碱基区，紫外光激发时发射明亮的蓝色荧光。激光扫描共聚焦显微镜（laser scanning confocal microscopy，LSCM）是 20 世纪 80 年代发展起来的一种高精度分子细胞生物学分析仪器，辅以各类免疫荧光探针或荧光染料与被测物质特异性结合，不仅可观察固定的细胞组织切片，还可对活细胞的结构、分子和离子进行实时动态的观察和检测。在细胞凋亡的研究中，激光扫描共聚焦显微镜已被广泛地应用于形态学、分子水平监测及重要生理改变等各方面。激光扫描共聚焦显微镜用点光源扫描标本的光学横断面，以代替普通光学显微镜所使用的场光源，并用探测针孔滤去离焦光线，所以消除了来自焦平面以外的衍射或散射光的干扰，可实现高清晰、高分辨率的组织细胞断层扫描，并且由于激光扫描共聚焦显微镜采用数字化成像，因而辅以一定的软件就能对图像进行定量分析及三维重建等操作。

Hoechst 是与 DNA 特异结合的活性染料，能够穿透完整的细胞膜，储存液用蒸馏

水配成 1mg/ml 的浓度，使用时一般用 PBS 稀释成终浓度为 10μg/ml。DAPI 为半通透性，用于常规固定细胞的染色。储存液用蒸馏水配成 1mg/ml 的浓度，使用终浓度一般为 10μg/ml。细胞凋亡时，细胞核会呈致密浓染，有时可呈碎块状致密浓染。

结果评判：

凋亡细胞体积变小，细胞质浓缩。Ⅰ期的细胞核呈波纹状（rippled）或呈折缝样（creased），部分染色质出现浓缩状态；Ⅱa 期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化；Ⅱb 期的细胞核裂解为碎块，产生凋亡小体。

（一）吖啶橙染色法

1）制备活细胞悬液，浓度约为 10^7 个/ml。

2）吸取 95μl 的细胞悬液，加入 5μl 的吖啶橙贮存液，混匀。

3）用滴管吸一滴混点在洁净的玻片上，用盖玻片封片。

4）荧光显微镜选用激发滤片 BG 12 或 BV 等，阻断滤片用 515nm 或 SP3。

（二）Hoechst33258、Hoechst33342 染色法

1. 先染色再固定

1）将 Hoechst33342 或 Hoechst33258 加入培养的细胞中，终浓度为 10μg/ml，37℃孵育 30min。

2）4%的多聚甲醛和培养液以 1∶3 混合，使多聚甲醛的浓度为 1%，固定细胞 5～10min。

3）固定好后，将细胞悬液涂在载玻片上，加盖玻片封片。

4）荧光显微镜激发滤片选用 UV 激发滤片，阻断滤片为 400～500nm。

2. 也可先固定后染色

1）收集 0.5×10^6～3.0×10^6 个细胞，400*g* 离心 5min 去上清。

2）PBS 洗 1 次，400*g* 离心 5min 去 PBS。

3）用 3%多聚甲醛 50μl 重悬细胞，室温下固定 10min。

4）PBS 洗 1 次，400*g* 离心 5min 去 PBS。

5）用 15μl 的 Hoechst33258 或 Hoechst33342 重悬细胞，终浓度约为 10μg/ml，孵育 15min。

6）取 10μl 放在玻片上，荧光显微镜下观察。

3. 也可对贴壁细胞作原位染色

1）在 24 孔或 6 孔板底里放置洁净盖玻片，使贴壁生长的对数期细胞铺在板上，让其爬片生长，待长到 50%～80%满时，凋亡诱导剂处理细胞。

2）将不同时间点处理的细胞进行免疫荧光染色，染色步骤同上。

3）将染色的爬片细胞放于一张滴有少量甘油的载玻片上，荧光显微镜观察。如图 26-1（见书后彩图）和图 26-2（见书后彩图）所示。

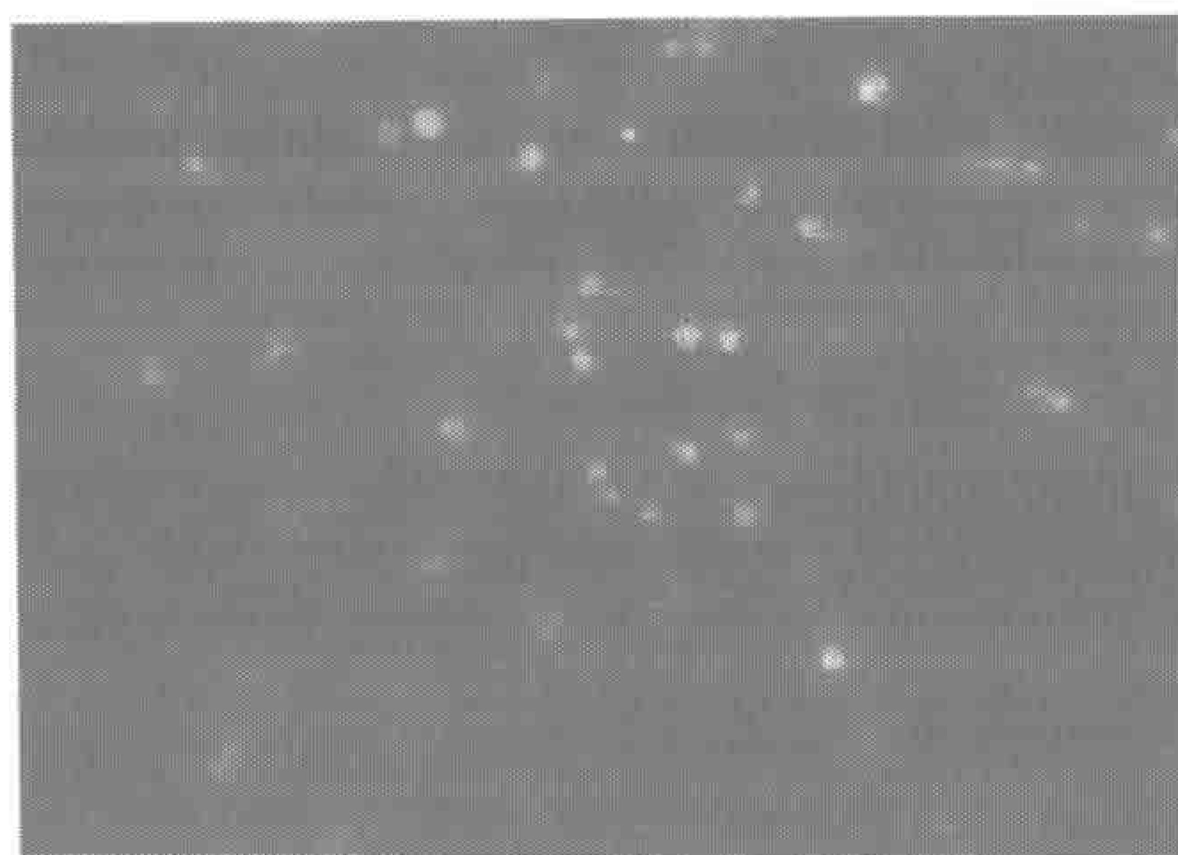


图 26-1　小鼠 RAW264.7 巨噬细胞在药物处理后发生凋亡（Hoechst33258 染色）

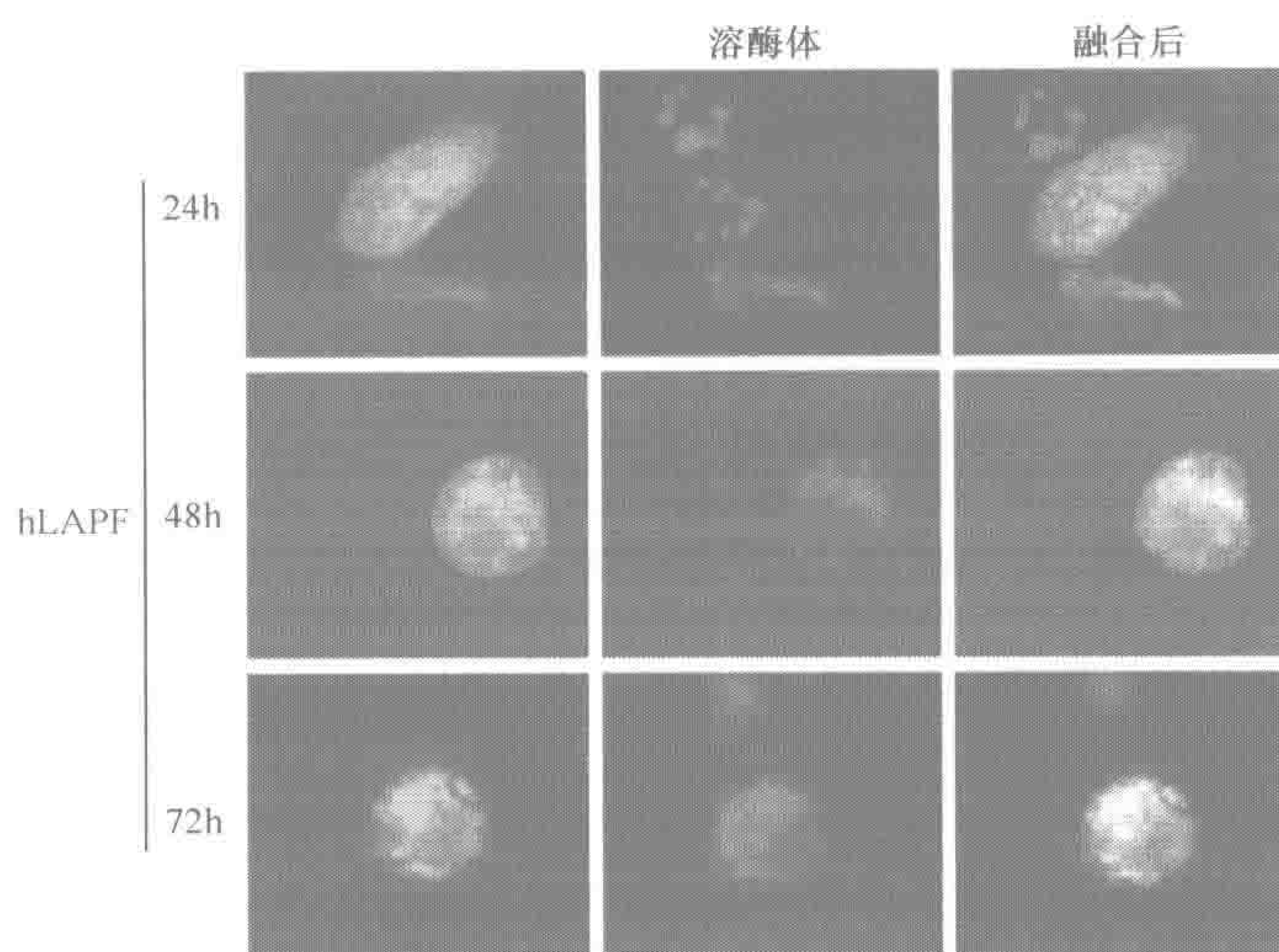


图 26-2　激光共聚焦显微镜显示在 L929 细胞凋亡过程中 LAPF 分子从胞质转位到溶酶体（LAPF 是一个溶酶体相关的凋亡诱导蛋白基因）

三、电子显微镜

Kerr 等首先应用电子显微镜技术观察细胞的凋亡。电子显微镜技术可以提供最详细的细胞形态信息，因此能更精确测定组织的细胞凋亡，也被认为是检测细胞凋亡的金标准。但是，与其他方法相比，它有昂贵和耗时长的缺点。电子显微镜技术包括透射电子显微镜和扫描电子显微镜，前者可以观察细胞内细胞器和细胞膜结构变化，而后者用于观察凋亡细胞形态结构和细胞表面的改变。细胞程序性死亡后，可在扫描或透射电镜下观察到“凋亡小体”，该小体系由细胞膜卷曲、脱落形成的小泡，其内包含有完整的细胞器及核片段。这种小体易被巨噬细胞、上皮细胞等吞噬，以使机体清除正常发育过程中死亡的细胞。细胞坏死则无此小体形成。但是并非所有发生程序性死亡的细胞都形成凋亡小体。

材料与试剂

透射电子显微镜或扫描电子显微镜，组织切片机，离心机，离心涂片机，戊二醛固

定液，溶液配方：戊二醛固定液：取 25%戊二醛原液 10ml，加入 0.2mol/L PBS 液 50ml，再加入蒸馏水 40ml，混匀，4℃保存

锇酸固定液：将含有 1g 锇酸的小瓶浸入清洁液过夜，用双蒸水冲洗数遍后，将小瓶放在盛有 50ml 双蒸水的 100ml 棕色磨口瓶内，击破锇酸小瓶使其内锇酸溶于水，1～5ml 小瓶分装，避光，4℃保存，用时再稀释 1 倍成 1%的应用液

步骤（透射电镜为例）

1）离心收集约 5×10^6 个细胞，用 PBS 洗涤 2 次，加入 1ml 2.5%戊二醛（冰预冷）悬浮细胞，移入 1.5ml EP 管中，室温下 1000g 离心 15min，使细胞聚成团块，弃去上清，换上新鲜固定液继续固定细胞 1～2h。

2）在磷酸缓冲液里漂洗 1～2h 或更长时间，尽量将戊二醛洗净，用 1%的锇酸固定液固定1～2h。

3）加入 50%乙醇脱水 10min→70%乙醇 10min→90%乙醇 10min→90%丙酮 10min→100%丙酮 3 次各 10min。

4）丙酮与环氧树脂 1∶1 包埋 2h，再放入纯包埋剂（环氧树脂包埋全浸透）数小时或过夜。

5）环氧树脂包埋，62℃烤箱 2d，进行超薄切片，用醋酸铅铀双染法进行切片染色。

6）在透射电子显微镜下观察细胞形态、细胞质及细胞核的变化。

扫描电镜样品的固定、漂洗和脱水等处理所用的试剂和方法基本上与透射电镜的样品相同，但由于扫描电镜观察的是样品的表面，主要是要求保持样品表面的原貌，因此，在固定、漂洗和脱水过程与透射电镜样品处理也有不同之处。一般在 4℃的条件下完成固定比较好，戊二醛、锇酸均可单独固定，也可用“戊二醛-锇酸”双重固定法。干燥常采用临界点干燥法。干燥是扫描电镜样品较重要的步骤，要充分干燥。粘贴样品后进行表面导电处理，主要有金属镀膜法和组织导电处理法两种，然后可进行扫描电镜观察。

结果判断

电子显微镜是目前观察细胞形态最好的方法，细胞核和细胞器的结构清晰易辨。凋亡细胞的染色质固缩并凝结成块，聚集在核膜周边呈新月状或环状小体，细胞质浓缩，内质网变疏松并与胞膜融合，形成一个个的空泡，线粒体结构无明显改变。细胞凋亡的晚期，细胞核裂解为碎块，产生凋亡小体。坏死细胞的染色质稀疏呈细颗粒状，分布无规律，边界不清，细胞质肿胀，细胞器结构破坏，细胞膜不完整。如图 26-3、图 26-4 所示透射电镜下可见到凋亡细胞的染色质浓缩，聚集在核膜周边，内质网与胞膜融合形成空泡。扫描电镜下可见胞膜出芽形成小泡。

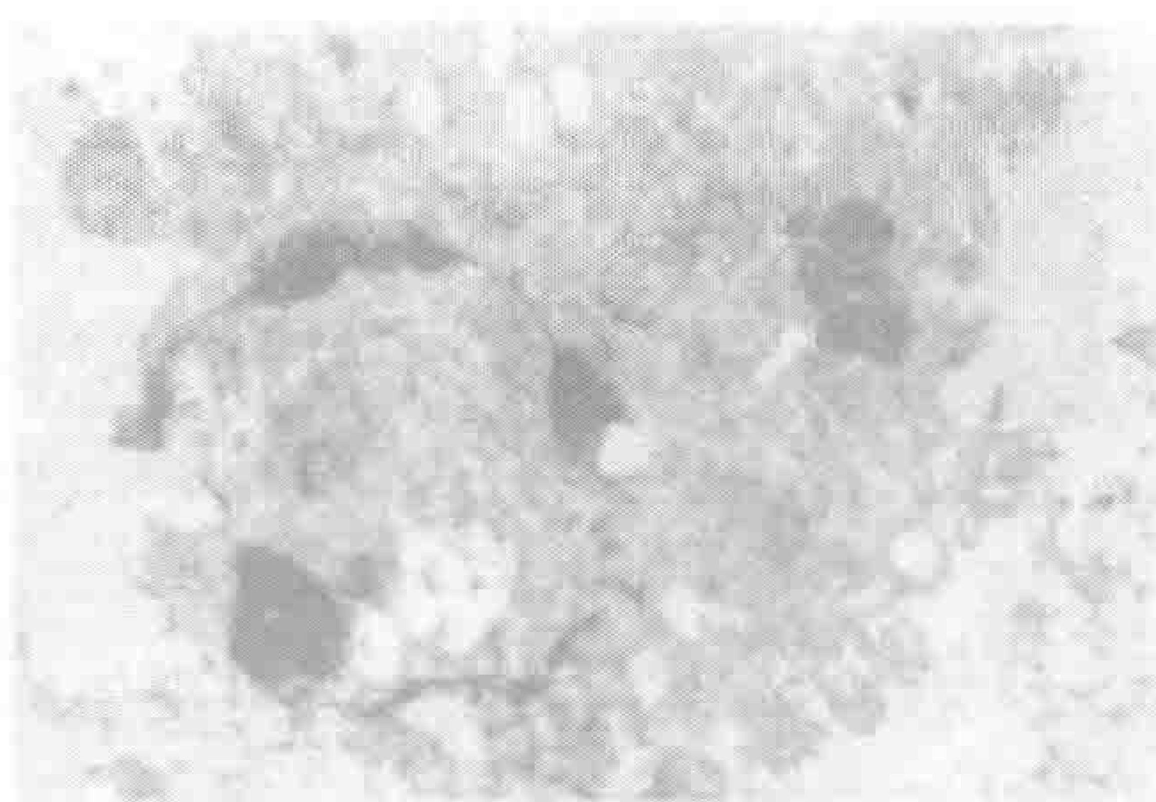


图 26-3　透射电镜下观察 L929 细胞的凋亡

注意事项

1）戊二醛固定时间可以适当延长，一般不要超过一周，期间要更换一次固定液，且要保持低温固定，充分清洗后再进行

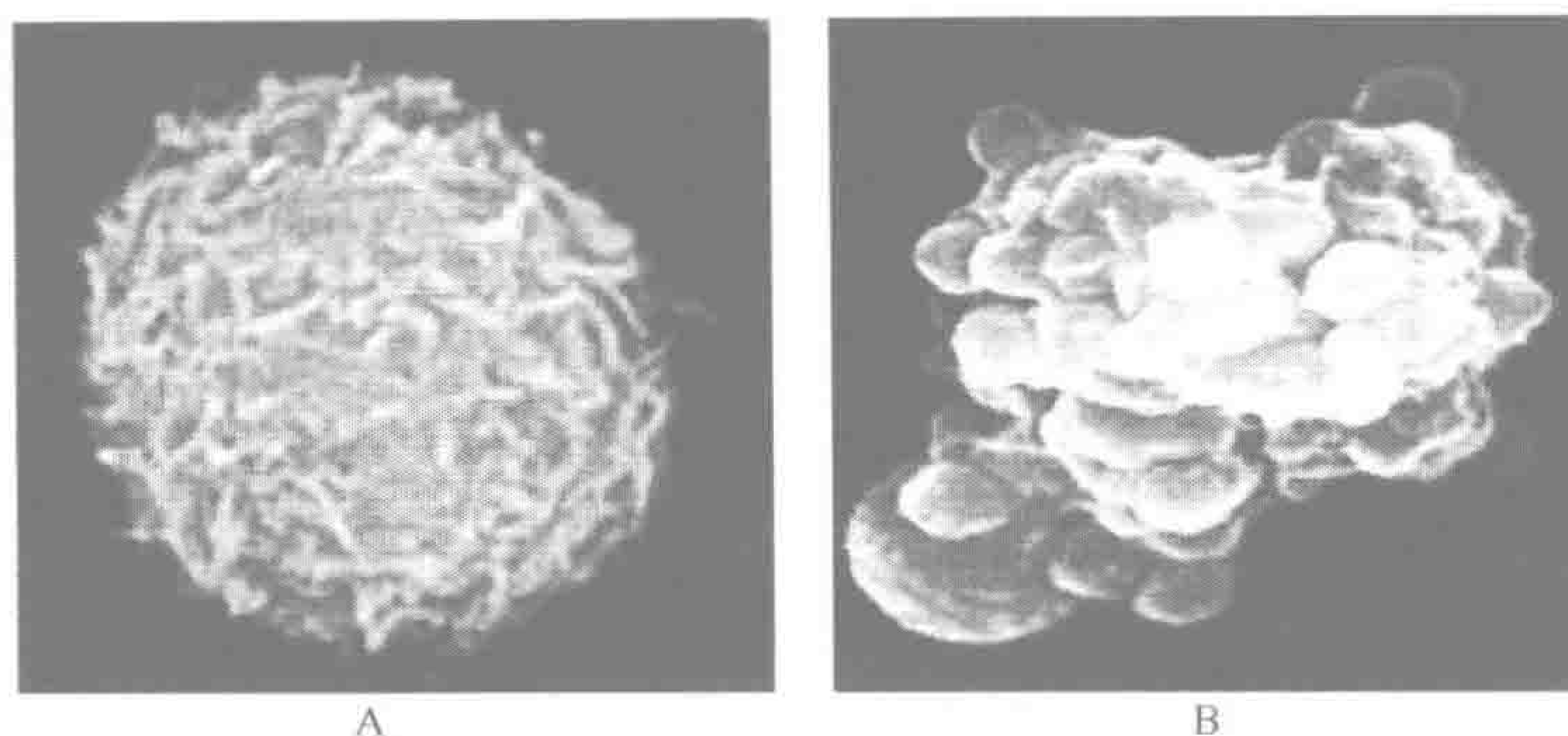


图 26-4　扫描电镜下的凋亡细胞形态

A. 正常细胞；B. 凋亡细胞

锇酸固定 1～2h，时间不要太长。

2）样品浸透、包埋，一定要保持干燥，浸透彻底。

3）包埋时动作要轻巧，防止产生气泡。

第二节　生化和分子生物学检测

凋亡发生时，线粒体呼吸链受损，使细胞生成 ATP 的量减少；跨膜电位降低，细胞色素 c 从线粒体内漏到胞质中；线粒体膜的通透性升高。胞质中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度升高，可以激活限制性内切核酸酶和蛋白酶。激活的限制性内切核酸酶可以将 DNA 切成 50～300kb 大小的 DNA 片段，然后进一步将染色质裂解成单个核小体和寡聚核小体，形成 180～200bp 的 DNA 片段。而蛋白酶可以控制不同阶段的凋亡的发生，与此同时胞质中 pH 也发生了改变。该生物化学特征可利用琼脂糖凝胶电泳、原位末端转移酶标记技术等方法来检测凋亡。

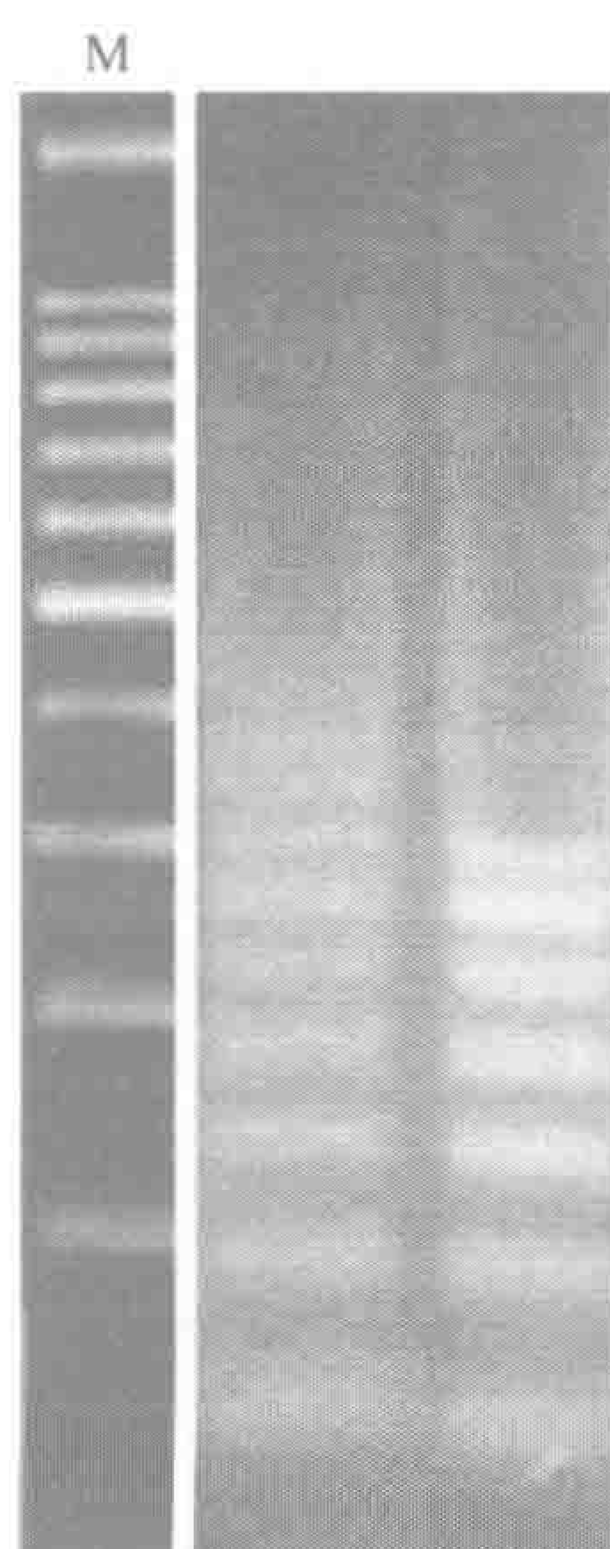


图 26-5　凋亡细胞的特征性 DNA ladder

一、DNA 梯状图谱

染色质 DNA 在核小体单位之间的连接处断裂，切成 50～300kb 长的 DNA 大片段，进而形成 180～200bp 整数倍的寡核苷酸片段，在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱（DNA ladder）。细胞经处理后，采用常规方法分离提纯 DNA，进行琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色，可见凋亡细胞的 DNA 电泳呈现独特的梯形图谱，而坏死的细胞提取纯化 DNA，在进行电泳会出现模糊的连续膜状条带（图 26-5）。

材料与试剂

细胞样品，细胞裂解液，酚，氯仿，异丙醇，乙醇，琼脂糖，TE 缓冲液，上样缓

冲液，溴化乙锭，NP-40，RNase，蛋白酶 K 等

步骤

处理后的细胞提取 DNA（可采用不同的抽提方法），进行常规的琼脂糖凝胶电泳。

1. 操作方法举例一

1）收集细胞（5×10^6 个），1000r/min 离心 5min，去上清。PBS 洗涤，去上清。

2）加细胞核裂解液 500μl 重悬细胞，50℃水浴，3～5h，不时振摇或 37℃过夜。

3）加 0.5ml 平衡酚抽提，上下颠倒几次混匀，6000r/min 离心 5min。

4）上清移至另一 Eppendorf 管，加 0.5ml 氯仿：异戊醇抽提，上下颠倒几次混匀，6000r/min 离心 5min。

5）上清移至另一 Eppendorf 管，加 50μl 的 3mol/L 乙酸钠和 2ml 预冷无水乙醇，上下颠倒几次混匀，可见絮状白色沉淀物。

6）12 000r/min 离心 10min 沉淀 DNA，去上清，吹干残存液体。

7）加 50～100μl TE 缓冲液，另加 5μl RNase，37℃水浴 30min。

8）取 20μl 加上样缓冲液 2～5μl，1%琼脂糖凝胶电泳（电压 50V，1.5～2h），UV 下观察。

2. 操作方法举例二（与方法一相比，省略了酚氯仿抽提，操作更简单）

1）收集细胞，1000r/min 离心 5min，去上清。

2）用冰预冷的 70%乙醇固定，可长期保存于－20℃冰箱。

3）1000r/min 离心 5min，去除固定液，用 0.5ml 的 PBS 重悬细胞。

4）转入 Eppendorf 管中，离心去上清。

5）细胞用 50μl PC 缓冲液（1.611% Na_2HPO_4，0.074%柠檬酸钠，pH7.8）重悬，室温 30～60min。

6）1000r/min 离心 5min，吸上清于新的 Eppendorf 管中，真空浓缩 15min。

7）加入 0.25% NP-40 溶液 3μl，1mg/ml RNase A 溶液 3μl，37℃，30min。

8）加入 3μl 的 1mg/ml 蛋白酶 K，37℃，30min。

9）加入 12μl 样品稀释液，含溴化乙锭的 1.5%琼脂糖电泳，观察。

目前有些公司出品了凋亡 DNA Ladder 抽提试剂盒，操作更加简单，不需要有机抽提，如采用离心柱提取 DNA 或选择性提取凋亡 DNA Ladder。

注意事项

1）电泳时应注意电压要低，最好控制在 50V 以下。

2）可使用宽度较小和厚度较小的样品梳子。

3）电泳距离不要太长，否则将使小的凋亡 DNA 条带弥散而降低分辨率。

4）抽提 DNA 时混匀动作不要太剧烈。

二、原位末端转移酶标记技术

细胞凋亡中，染色体 DNA 双链断裂或单链断裂而产生大量的黏性 3′—OH 端，可

在脱氧核糖核苷酸末端转移酶（terminal deoxynucleotidyl transferase，TdT）的作用下，将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3′端，则可原位特异地显示出凋亡细胞，从而可进行凋亡细胞的检测，这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法（terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling，TUNEL）。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂，因而没有 3′—OH 形成，很少能够被染色。TUNEL 实际上是分子生物学与形态学相结合的研究方法，对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色，能准确地反应典型的细胞凋亡生物化学和形态特征，可用于石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、培养的细胞和从组织中分离的细胞的形态测定，并可检测出极少量的凋亡细胞。结果判定：活细胞的细胞核在苏木精复染后呈蓝色，核相对较大，形状、大小较为一致。凋亡细胞的细胞核中出现碎点，核的形状不规则，大小不一。该方法操作简单、省时、敏感性可靠。主要应用的是荧光标记法和酶标记法。

（一）荧光标记法

材料与试剂

采用德国 Boehringer-Mannheim 公司 In Situ Cell Death Detection 试剂盒，或美国 Oncor 公司 ApopTagTM 试剂盒，包括：生物素标记的-dUTP（Biotin-dUTP）或地高辛标记的-dUTP(Digoxingeningll -dUTP)1nmol/μl、TdT 酶（25U/μl）、反应缓冲液、洗涤缓冲液、异硫氰酸荧光素（FITC）标记的亲和素或链霉亲和素（2.5μg/ml）或抗地高辛抗体

PI 染液（含 PI 5μg/ml 及无 DNA 酶活性的 RNA 酶 0.1%）

PBS 缓冲液

塑料盖玻片

样品：悬浮细胞的甩片或涂片、贴壁培养的细胞，或冰冻切片、常规石蜡切片

步骤

1）固定：培养细胞的制片或冰冻切片用 4%多聚甲醛固定 30min（4℃）后，用 80%乙醇再固定 2h（−20℃）。用 4%中性福尔马林固定、石蜡包埋制备的切片需进行脱蜡、水化。

2）洗涤：玻片浸入 PBS 缓冲液，摇床上洗涤 5min，3 次。

3）反应：洗涤后的玻片用吸水纸吸干细胞或组织周围水分，按 50μl/cm^2 滴加反应液（每 50μl 反应液含 TdT 酶 0.5μl，标记的-dUTP 1μl），使反应液均匀地覆盖于所有细胞或组织切片上，盖上塑料盖玻片，置湿盒中，37℃孵育 1h。

4）终止：将玻片放到盛有洗涤缓冲液的染色缸内，洗涤 2 次，每次 5min。

5）FITC 标记：洗涤后的玻片用吸水纸吸干细胞或组织周围水分，按 50μl/cm^2 滴加 FITC 反应液（含 FITC 2.5μg/ml），室温下避光孵育 10～15min。

6）洗涤：将玻片置于洗涤缓冲液内，洗涤 2 次，每次 5min。

7）PI 复染：将玻片置于盛有 PI 染液的染色缸内，室温下避光染色 30min。

8）封片：用盖玻片直接盖在含 PI 染液的玻片上，也可用无色指甲油涂于盖玻片四周边缘，置暗处。

结果判定

用荧光显微镜观察，选用蓝色激发光（波长 488nm），所有的细胞核均被 PI 着色，显示出红色荧光，而凋亡细胞被特异地标记上 FITC，显示出绿色荧光。

（二）酶标记法

较之荧光标记法，实验原理相同，主要在于显色方式不同，酶标记法不需用荧光显微镜，并可较长时间保存片子。

材料与试剂

采用美国 Oncor 公司 ApopTag™-Peroxidase 试剂盒：过氧化物酶标记的抗地高辛抗体、反应缓冲液、TdT 酶、反应终止/洗涤液、平衡缓冲液

蛋白酶 K 消化液（20μg/ml 蛋白酶 K 溶于 PBS），30% H_2O_2

DAB 显色液：0.05%的 DAB（diaminobenzidine）溶于 PBS，用前过滤并加入 0.02% H_2O_2

甲基绿染液：0.5%甲基绿溶于 0.1mol/L 枸橼酸钠，pH 调整到 4.0

塑料盖玻片及玻璃盖玻片

样品：同荧光标记法

步骤

1）固定：同荧光标记法。

2）内源性过氧化物封闭：将玻片置于含 0.5% H_2O_2 缓冲溶液的染色缸内，室温下封闭 20min 后，将玻片放到盛有洗涤缓冲液的染色缸内，洗涤 2 次，每次 5min。

3）消化：玻片浸于盛有蛋白酶 K 消化液的染色缸，室温下消化 15min，洗涤同上。

4）平衡处理：将细胞或组织周围液体用吸水纸吸干，滴加平衡缓冲液（按 $70\mu l/cm^2$）覆盖细胞或组织表面，盖上塑料盖玻片，室温下作用 5～10min。

5）反应：移去盖玻片，用吸水纸吸干周围液体，滴加反应液（按 $50\mu l/cm^2$，18μl TdT 酶＋36μl 反应缓冲液），均匀覆盖在细胞或组织上，盖上塑料盖玻片，置于湿盒中，37℃温育 1h。

6）终止反应：移去盖玻片，将玻片置于盛有终止/洗涤液的染色缸内，37℃下洗涤 30min（置摇床上）。将玻片置于洗涤缓冲液内，洗涤 2 次，每次 5min。

7）地高辛抗体反应：用吸水纸吸干细胞或组织周围液体，滴加 70μl 过氧化物酶标记的抗地高辛抗体，均匀覆盖，加上塑料盖玻片，室温下置于湿盒中，孵育 30min。

8）洗涤：置于洗涤缓冲液内，洗涤 2 次，每次 5min。

9）用吸水纸吸干细胞或组织周围液体，滴加新鲜配制的 DAB 显色液，均匀覆盖，加上塑料盖玻片，室温下作用 3～5min。

10）洗涤：置于蒸馏水中洗涤 3 次，每次 3～5min。

11）套染：将玻片置于盛有甲基绿染液的染色缸中，室温染色 10min。

12）洗涤：蒸馏水洗涤 3 次（置于摇床上），每次 2min。

13）脱水、封片：100%正丁醇，3 次，每次 2min。二甲苯，3 次，每次 2min。用明胶甘油封片。

结果判定

光学显微镜下观察，所有的细胞核均着绿色，凋亡的细胞核染色质显示出特异性的棕黄色。

注意事项

1）组织石蜡切片需充分脱蜡和水化。水化用梯度乙醇从高浓度到低浓度浸洗，以便后面的结合反应充分、均匀。

2）把握好细胞通透的时间。一般根据切片的厚薄，选择蛋白酶 K 的孵育时间，几微米切片用短时间，几十微米切片用长时间。

3）可适当延长 TUNEL 反应液的时间。一般是 37℃ 1h 即可，也可根据凋亡损伤程度，选择更长的时间，但要结合最终的背景着色。

4）在 TUNEL 反应后和酶标反应后的清洗应充分，可增加次数达 5 次，因为清洗影响最后切片的非特异性着色。

三、酶学检测

细胞凋亡时，由于钙-镁依赖性核酸酶进入核小体间切割 DNA，产生 180～200bp 或其倍数的核小体片段，而核小体由于与组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 形成紧密复合物而不被内切核酸酶切割。利用核小体进行的酶学检测而建立了夹心酶联免疫吸附法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA），应用小鼠抗 DNA 和抗组蛋白的单克隆抗体，与核小体片段形成夹心结构，可特异性检测细胞溶解物中的核小体片段。该方法更具有特异性、高敏感性，较少的细胞就可获得结果。其原理与常规 ELISA 一致，就是利用单克隆抗体特异性定量测定凋亡过程中裂解的单核小体或寡核苷酸小体。反应在包被链霉亲和素的微孔板中进行，加入生物素标记的抗组蛋白抗体、过氧化物酶（-POD）标记的小鼠抗 DNA 单克隆抗体后，可借助生物素与链霉亲和素的高度亲和力（放大系统），显著提高检测的敏感性。

结果以释放到细胞质中的单或寡核苷酸小体的特异性增加量（EF）判定。EF＝凋亡样本的 mU 值（发生凋亡的细胞）/相应正常样品的 mU 对照值，mU＝吸收值（10^3）＝双孔吸收值的平均 OD 值－底物 OD 值。若样品的吸收值超过比色测定范围，应适当稀释后再检测。

材料与试剂

样品：培养细胞或离体细胞的裂解物

检测采用 Boehringer Mannheim 公司试剂盒，包括以下试剂：生物素标记的小鼠抗组蛋白单克隆抗体、过氧化物酶（-POD）标记的小鼠抗 DNA 单克隆抗体、链霉

亲和素包被的微孔板、DNA-组蛋白复合物（作为阴性对照）、ABTS底物、溶解缓冲液、温育缓冲液、底物缓冲液

步骤

1）细胞裂解：收集细胞，离心后，用200μl溶细胞缓冲液重新悬浮，室温下作用30min。取样品离心后（1000r/min离心10min），吸取20μl上清，加入到链霉亲和素包被的微孔培养板孔中。

2）加入80μl免疫反应试剂，含POD-抗DNA抗体、生物素标记的抗组蛋白抗体及温育缓冲液（按1∶1∶18混合），室温下孵育2h（置摇床上，250r/min）。

3）取上清，用300μl温育缓冲液洗涤3次，移去洗涤液。

4）加入100μl底物缓冲液，室温下孵育（置摇床上）使颜色变化至合适。

5）作比色分析，用底物缓冲液作空白对照，以波长405nm进行检测，参考波长492nm。

注意事项

1）移去洗涤液时动作要小心轻柔。

2）操作完成后要尽快做比色分析（10～20min内）。

第三节　流式细胞仪检测

流式细胞术（flow cytometry，FCM）是20世纪70年代发展起来的一种利用流式细胞仪对细胞等生物粒子的理化及生物学特性（细胞大小、DNA/RNA含量、细胞表面抗原表达等）进行定量、快速、客观多参数相关检测分析的新技术。它借鉴了荧光显微镜技术与血球计数原理，同时利用荧光染料、激光技术、单克隆抗体技术以及计算机技术的发展，大大提高了检测速度与统计精确性。FCM在生命科学中的应用，标志着细胞生物学、肿瘤学、免疫学等进入了细胞和分子水平的研究。

一、细胞周期时相分析和亚二倍体

在生物细胞核中，DNA含量并非恒定，随细胞增殖周期时相不同而发生变化。G_0期是第一次细胞分裂完成后进入第二次分裂开始前的阶段。G_0期细胞是不参与细胞增殖的一群细胞，为静止期细胞，其细胞DNA含量为较恒定的二倍体（diploid）。G_1期指第二次分裂开始到本次DNA复制之前的过程，此期主要功能是积累能量和原料，为DNA的复制做准备，故又称DNA合成前期。G_0期和G_1期是细胞处于周期过程中两种不同功能状态时相的细胞，但就DNA含量而言，均为二倍体DNA含量。S期又称DNA合成期，当细胞进入S期后，DNA含量值逐渐从二倍体到四倍体增加，直到细胞DNA倍增结束，进入G_2期。G_2期指从DNA复制完成到有丝分裂开始的时间区间，又称DNA合成后期或有丝分裂前期，此期合成大量蛋白质。经过G_2期后细胞最终进入M期，即有丝分裂期。在M期分裂为两个子细胞之前，G_2期和M期的DNA含量均为恒定的四倍体细胞群。碘化丙锭（PI）可以与细胞内DNA和RNA结

合，采用 RNA 酶将 RNA 消化后，通过流式细胞术检测到的与 DNA 结合的 PI 荧光强度直接反映了细胞内 DNA 含量的多少。根据 DNA 的含量可以将细胞周期各时相区分为 G_1/G_0 期、S 期和 G_2/M 期，并可通过特殊软件计算各时相的百分率。由于凋亡细胞 DNA 被降解，导致对 DNA 染料着色能力下降，用 PI 荧光染料对 DNA 降解进行测定会出现亚二倍体峰。

材料与试剂

70%乙醇，50μg/ml PI（含 1% Triton-X 100），0.5mg/ml RNase A，PBS

6 孔培养板

流式细胞仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤

1）样品收集：贴壁细胞胰酶消化后制成单细胞悬液，离心收集细胞，弃上清，用预冷 PBS 漂洗细胞 2 次。

2）样品固定：加入预冷 70%乙醇，4℃固定过夜，或－20℃长期固定（4℃过夜一般隔天进行检测，如需长期保存样品，应置于－20℃保存，但最好在一周内完成样品测定）。

3）细胞染色：离心，弃固定液，PBS 洗一次并重悬细胞。加 100μl RNase A (0.5mg/ml)至终浓度为 50μg/ml，37℃孵育 30min。

4）PBS 洗涤一次，再加入 500μl PI 染色液混匀，4℃避光孵育 30min。

5）流式分析：上机测试，记录激发波长 488nm。以标准程序用 FACScan 流式细胞仪检测胞内 DNA 含量和亚二倍体凋亡峰，使用 Mac V1.01 版本的 CELLQUEST 和 ModFIT LT 软件分析。如图 26-6（见书后彩图）所示，凋亡细胞由于 DNA 被降解，对 DNA 染料着色能力下降，用 PI 荧光染料对 DNA 降解进行测定会出现亚二倍体峰。

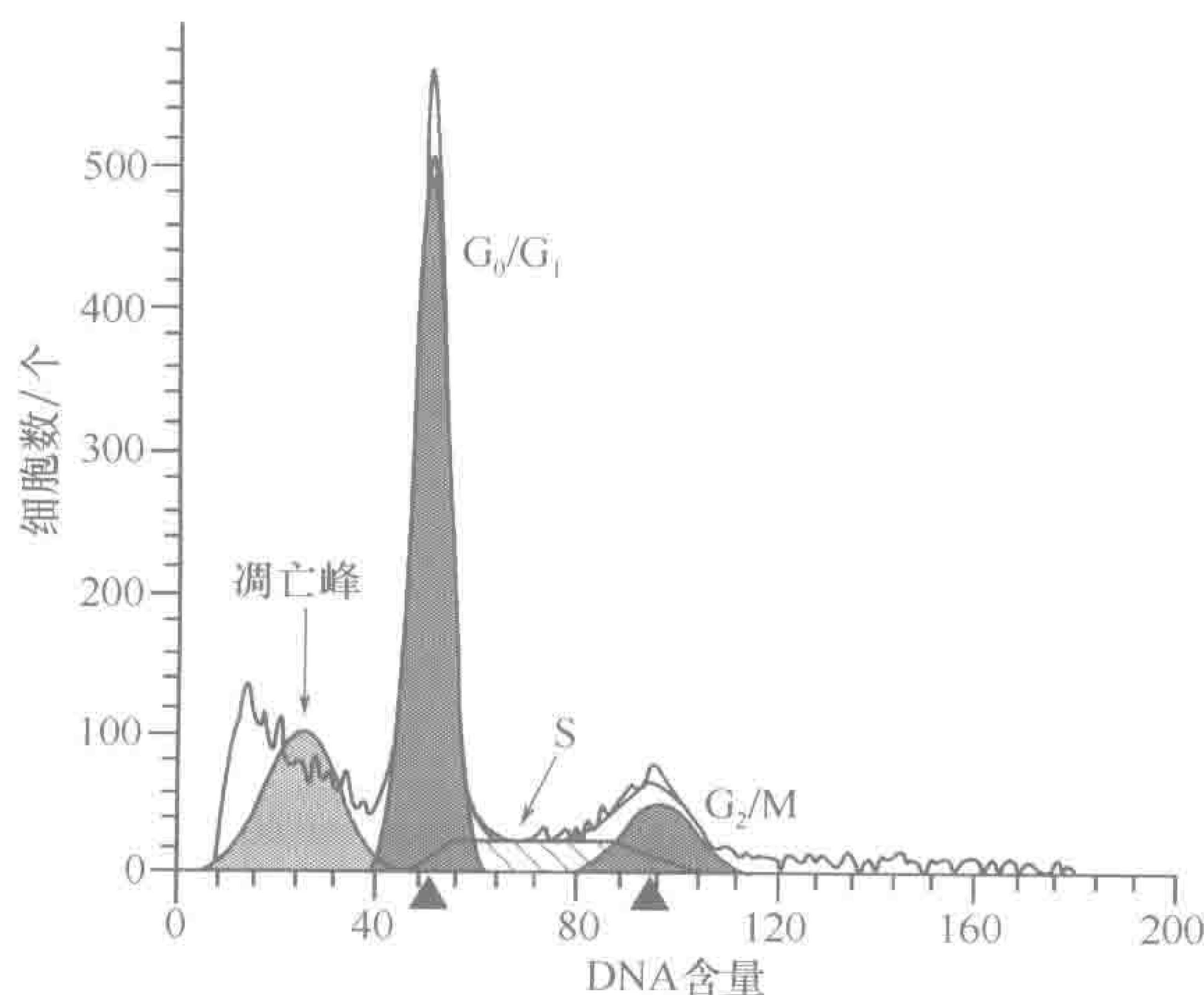


图 26-6　流式细胞术分析 PI 染色的细胞 DNA 含量的变化

注意事项

1）起始样品细胞最好在 10^6 个以上。固定，漂洗会丢失大量细胞，以免影响检测结果。

2）醛类固定会影响 PI 与核酸的结合。

二、Annexin V 结合 PI 或 7-AAD 染色

Annexin V 结合 PI 或者 7-AAD（7-amino-actinomycin D）法是目前检测细胞凋亡和区分坏死细胞特异性较强的方法。磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine，PS）正常位于细胞膜的内侧，但在细胞凋亡的早期，由于细胞膜失去对称性，PS 可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。Annexin V 是一种分子质量为 35～36kDa 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，能与 PS 高亲和力特异性结合。7-AAD 和 PI 都是核酸染料，不能透过完整的细胞膜，但能够透过凋亡中晚期的细胞和死细胞，使细胞核红染。7-AAD 同 PI 有着相似的荧光特性，但其发射波谱较 PI 窄，对其他检测通道的干扰更小，在多色荧光分析中是 PI 的最佳替代品。凋亡早期细胞仍保持膜的完整性，PI 和 7-AAD不能进入细胞内，凋亡晚期细胞可同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色。由于该方法染色时间短（仅 10min 即可完成），检测速度快（半分钟即可完成一份样品的测量），对细胞活性影响不大，用该样品进一步地打孔，再加入饱和剂量的 DNA 染料对细胞内的 DNA 进行染色，然后进行 DNA 含量检测和细胞周期分析，可在很短的时间（35min）内获得理想的细胞凋亡、细胞坏死和细胞周期各时相的百分数变化结果。

材料与试剂

Annexin V（20μg/ml），PI（50μg/ml），PBS

6 孔培养板

流式细胞仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤

1）细胞收集：收集正常培养和诱导凋亡的悬浮细胞，PBS 洗 2 次。贴壁培养的细胞先用 0.25％的胰酶消化。

2）细胞染色：100μl 含荧光标记的 Annexin V（20μg/ml）的 PBS 重悬细胞，室温避光 30min。

3）再加入 PI（50μg/ml）5μl，室温避光反应 5min，加入 400μl PBS 立即用 FAC-Scan 进行流式细胞术定量检测（一般不超过 1h），同时以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。

4）流式细胞仪检测。如图 26-7 所示，L929 细胞经不同剂量的 TNF-α 作用 24h，出现明显的细胞凋亡，并呈剂量依赖性。AnnexinV 单阳性的细胞为早期凋亡细胞，Annexin V/PI 双阳性的细胞为晚期凋亡细胞。

注意事项

1）整个操作动作要尽量轻柔，避免用力吹打细胞。

2）操作时注意避光，反应完毕后尽可能在 1h 内检测。

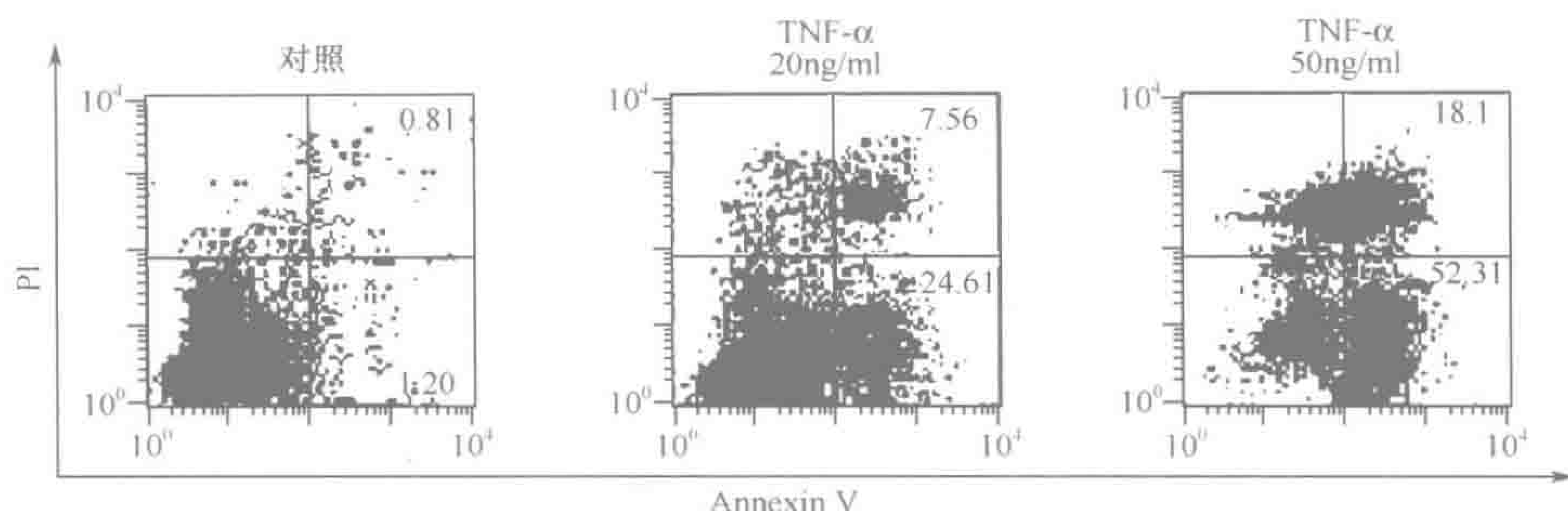


图 26-7　流式细胞仪分析 TNF-α 诱导的 L929 细胞凋亡

3）贴壁细胞需用不含 EDTA 的胰酶消化收集，且胰酶消化时间不宜过长，否则容易引起假阳性。

4）因为 Annexin V 是 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，所以 binding buffer 中必须含有钙离子。

三、线粒体膜电位的分析

线粒体在细胞凋亡的过程中起着枢纽作用，线粒体跨膜电位的下降发生在细胞核凋亡特征（染色质浓缩、DNA 断裂）出现之前，一旦线粒体崩溃，则细胞凋亡不可逆转。线粒体跨膜电位的存在，使一些亲脂性阳离子荧光染料如 Rhodamine 123、Tetrechloro-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide（JC-1）等可结合到线粒体基质，其荧光的增强或减弱说明线粒体内膜电负性的增高或降低。例如，罗丹明 123（Rhodamine 123，Rho 123）是一种可透过细胞膜的阳离子荧光染料，是一种线粒体跨膜电位的指示剂。其在正常细胞中能够依赖线粒体跨膜电位进入线粒体基质，与线粒体内膜结合。在凋亡发生时，线粒体膜完整性破坏，丧失结合 Rho 123 的能力，荧光强度降低。而 JC-1 在线粒体膜电位较高时，JC-1 聚集在线粒体的基质中，形成聚合物，可以产生红色荧光；在线粒体膜电位较低时，JC-1 不能聚集在线粒体的基质中，此时 JC-1 为单体（monomer），可以产生绿色荧光。用流式细胞仪监测荧光的变化来确定线粒体膜电位的变化，是检测细胞凋亡早期的一个重要手段。

材料与试剂

Rho 123 染液（0.1～50μg/ml），PBS

6 孔培养板

流式细胞仪（BD Bioscience 公司的 Calibur 或 LRS Ⅱ）

步骤（以罗丹明为例）

1）培养细胞 1×10^6 个/ml 重悬于培养基中。

2）加入 Rho 123 染液（0.1～50μg/ml），混匀。

3）37℃，5% CO_2 细胞培养箱避光孵育 15min。

4）用 Rho 123 染色缓冲液（或者 PBS）洗涤 2 次。

5）流式细胞仪检测：激发波长 488～505nm，发射波长 515～575nm（一般为

530nm）。如图 26-8 所示，凋亡的 L929 细胞线粒体膜完整性破坏，丧失结合 Rho123 的能力，荧光强度降低。

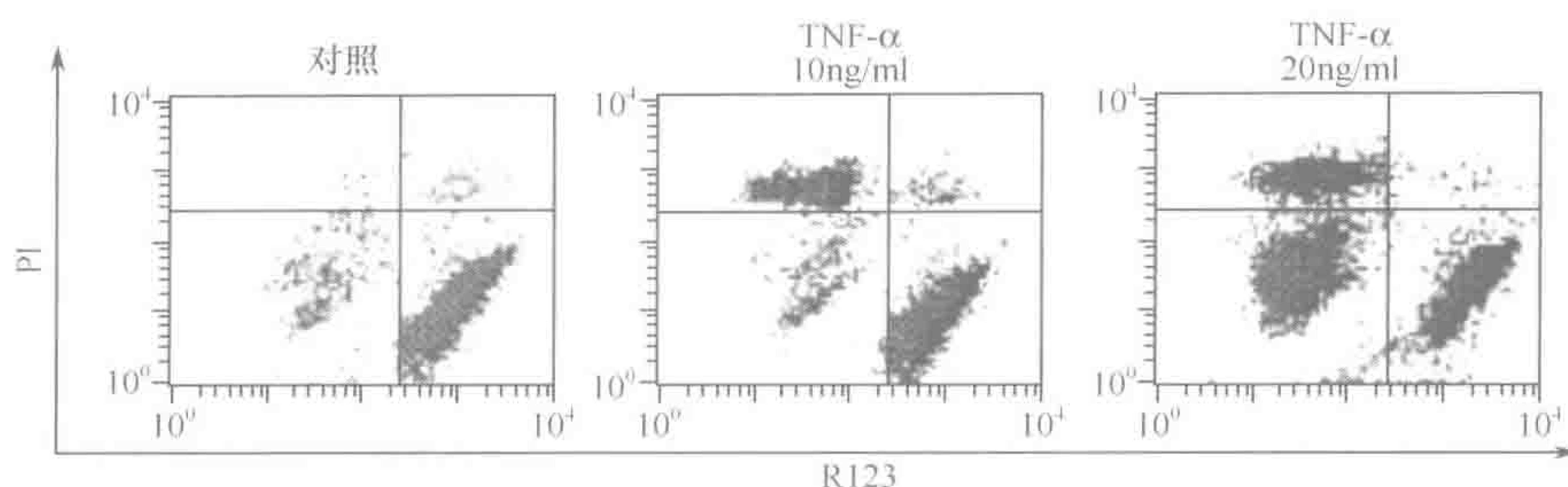


图 26-8　流式细胞仪分析的 TNF-α 诱导的 L929 细胞凋亡

注意事项

1）始终保持平衡染液中 pH 的一致性，因为 pH 的变化将影响膜电位。

2）与染料达到平衡的细胞悬液中如果含有蛋白质，它们将与部分染料结合，降低染料的浓度，引起假去极化。

3）根据细胞种类不同 Rho 123 浓度亦有所不同，一般为 3～10μg/ml。

第四节　凋亡相关分子的检测

细胞凋亡是一个主动过程，它涉及一系列蛋白质的激活、表达以及调控等的作用。天冬氨酸特异酶切的半胱氨酸蛋白酶（cysteinyl aspartate-specific proteinase，Caspase）家族是哺乳动物细胞中程序性死亡的介导者和执行者，凋亡信号首先活化不同的 Caspase 起始因子，再由起始因子激活级联下游的 Caspase 效应分子，最终由效应分子特异地水解细胞中的一系列底物而导致细胞解体。线粒体是细胞生命活动控制中心，它不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心，而且是细胞凋亡调控中心。细胞色素 c 从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤。

一、Caspase 检测

Caspase 家族蛋白是细胞内执行凋亡过程中最关键的环节之一，多数 Caspase 正常以非活性的前体形式存在，其分子中有 2 个位点被天门冬氨酸蛋白酶切割后形成 3 个亚单位，其中 N 端的亚单位参与活性 Caspase 的形成，其余 2 个亚单位形成多聚体发挥活性作用。Caspase 酶原的激活通常由上一级 Caspase 剪切所致，故这类酶自身催化，产生级联效应。当死亡受体接受死亡信号，引起上游 procaspase-8 的激活，导致 procaspase-9 激活，最终导致 Caspase-3、Caspase-7 激活。Caspase-3 和 Caspase-7 通过破坏细胞核纤层，直接导致细胞结构的破坏。Caspase-8 与 Caspase-3 在 Caspase 级联反应中分别在起始者与执行者上处于核心地位，是细胞凋亡发生的关键步骤及一切凋亡信号转导的共同通路。

（一） Western 印迹分析 procaspase-3 的活化

Caspase-3 正常以酶原（32kDa）的形式存在于胞质中，在凋亡的早期阶段被激活后，活化的 Caspase-3 由两个大亚基（17kDa）和两个小亚基（12kDa）组成。

材料与试剂

细胞裂解液
PBS
10%SDS-PAGE
转移硝酸纤维素薄膜
5%脱脂奶粉
一抗
HRP-标记的二抗
TBS(Tris 缓冲盐溶液)：20mmol/L Tris-HCl(pH7.5)
500mmol/L NaCl
TBS-T(0.05% Tween 20 的 TBS)

步骤

1） 收集细胞：PBS 洗涤，加入细胞裂解液，10 000*g* 离心 10min，取上清，检测蛋白质浓度。
2） 取含 20μg 蛋白质的标本上样，10%SDS-PAGE。
3） 转移硝酸纤维素薄膜，5%脱脂奶粉封闭，室温 2 h，4℃过夜。
4） Caspase-3 多抗或单抗室温反应 1～2h 或 4℃过夜，TBS-T 洗 3 次，5～10min/次。
5） HRP-标记的二抗室温反应 1～2h，TBS-T 洗 3 次，5～10min/次。
6） ECL 显影或 NBT/BCIP 显色。

如图 26-9 所示，凋亡发生过程中，无活性的 Caspase-3 前体被切割形成 P17、P12 亚单位。

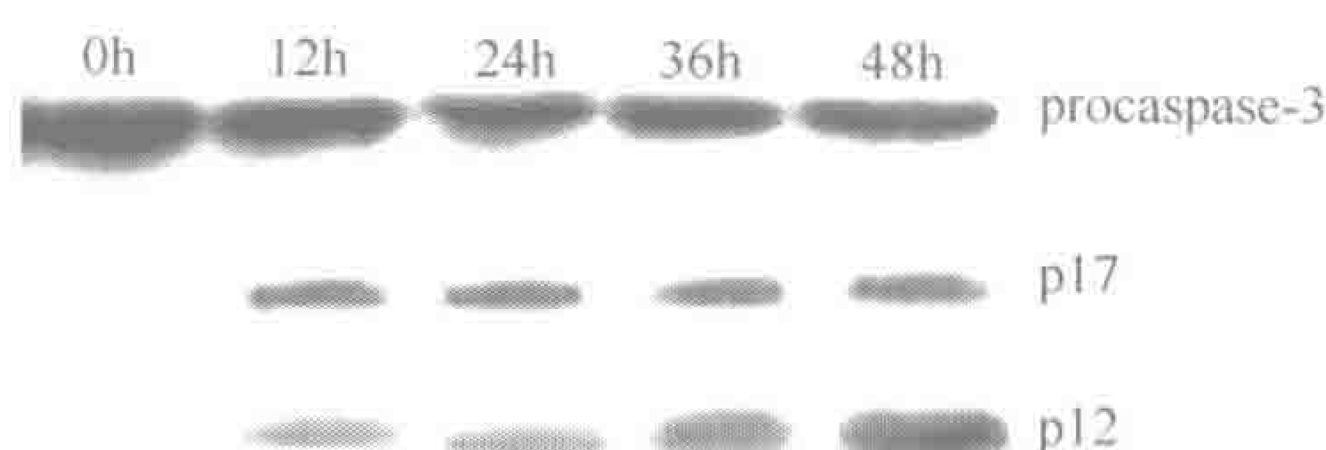


图 26-9　Western 印迹检测 Caspase-3 活化的片段

（二） 荧光分光光度计分析

活化的 Caspase-3 能够特异切割 D1E2V3D4-X 底物，水解 D4-X 肽键。根据这一特点，设计出荧光物质偶联的短肽 Ac-DEVD-AMC。在共价偶联时，AMC 不能被激发荧光，短肽被水解后释放出 AMC，自由的 AMC 才能被激发发射荧光。根据释放的 AMC

荧光强度的大小，可以测定 Caspase-3 的活性，从而反映 Caspase-3 被活化的程度。

材料与试剂

细胞裂解液，PBS，Ac-DEVD-AMC，荧光分光光度计

步骤

1）收集细胞：PBS 洗涤，加入细胞裂解液，10 000*g* 离心 10min，取上清。

2）加入 Ac-DEVD-AMC（Caspase-3 四肽荧光底物），37℃反应 1h。

3）荧光分光光度计（Polarstar）分析荧光强度（激发光波长 380nm，发射光波长为 430～460nm）。如图 26-10 所示，凋亡过程中，活化的 Caspase-3 能够特异切割 DEVD-X 底物，释放出来的底物激发后，产生荧光，根据荧光的强度可以推断 Caspase-3 的活性。

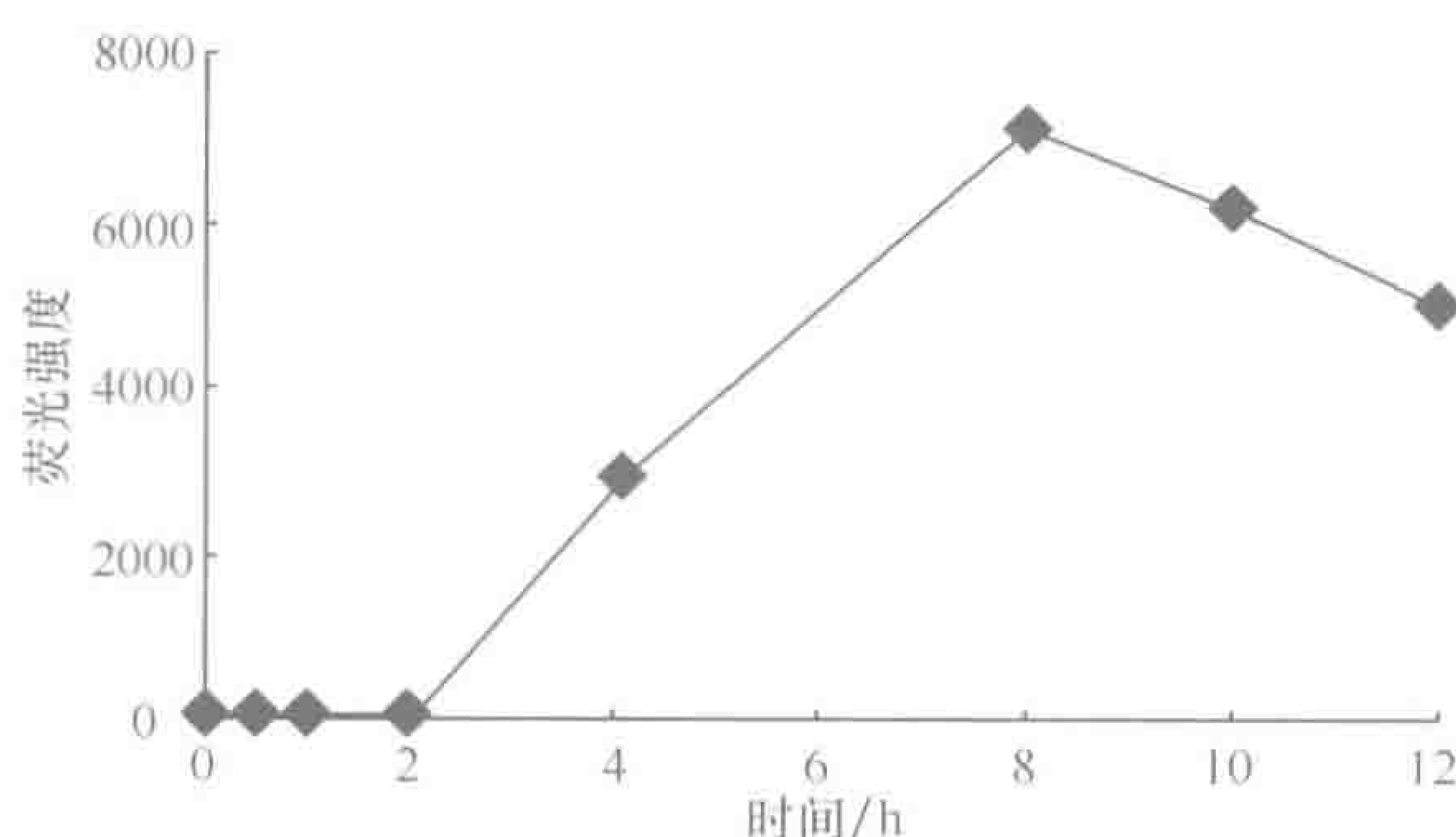


图 26-10　Polarstar 动态监测药物处理的 Jurket 细胞凋亡过程 Caspase-3 的活化情况

二、细胞色素 c 释放的检测

细胞色素 c（Cgt c）作为一种信号物质，在细胞凋亡中发挥着重要的作用。Cgt c 从线粒体释放的调节是细胞凋亡分子机制研究的关键问题。正常情况下，它存在于线粒体内膜和外膜之间的腔中，凋亡信号刺激使其从线粒体释放至细胞液，结合 Apaf-1（apoptotic protease activating factor-1）后启动 Caspase 级联反应。

材料与试剂

细胞裂解液，PBS，10%SDS-PAGE，转移硝酸纤维素薄膜，5%脱脂奶粉，一抗，HRP-二抗

TBS（Tris 缓冲盐溶液）：20mmol/L Tris-HCl(pH7.5)，500mmol/L NaCl

TBST（0.05% Tween 20 的 TBS）

超速离心机

步骤

1. 收集样品和分离线粒体

1）贴壁细胞胰酶消化后制成单细胞悬液，离心收集细胞，弃上清。

2）重悬于细胞质提取缓冲液中，匀浆处理，700*g* 离心 10min，弃沉淀（含细胞核

及未破碎细胞）。

3）取上清 4℃下 10 000*g* 离心 30min，收取以下两部分标本：一是线粒体部分，取沉淀物，重悬于线粒体提取缓冲液中，内富含线粒体片段，保存于−80℃待检；二是胞质部分，取上清，进一步离心（100 000*g*，1h）留取上清，待检胞质内 Cyt c 水平。

2. Western 印迹检测

1）取含 20μg 蛋白质的标本上样，10%SDS-PAGE。

2）转移硝酸纤维素薄膜，5%脱脂奶粉封闭，室温 2 h，4℃过夜。

3）Cyt c 多抗或单抗室温反应 1～2h 或 4℃过夜，TBS-T 洗 3 次，5～10min/次。

4）HRP-标记的二抗室温反应 1～2h，TBS-T 洗 3 次，5～10min/次。

5）ECL 显影或 NBT/BCIP 显色。如图 26-11 所示，谷氨酸作用海马神经元细胞元。神经元线粒体 Cyt c，即 Cyt c（Mit）减少，而胞质中 Cyt c 增多，即 Cyt c（Cyto）增多，提示谷氨酸诱导神经元凋亡，即凋亡信号刺激 Cyt c 从线粒体释放到胞质中。

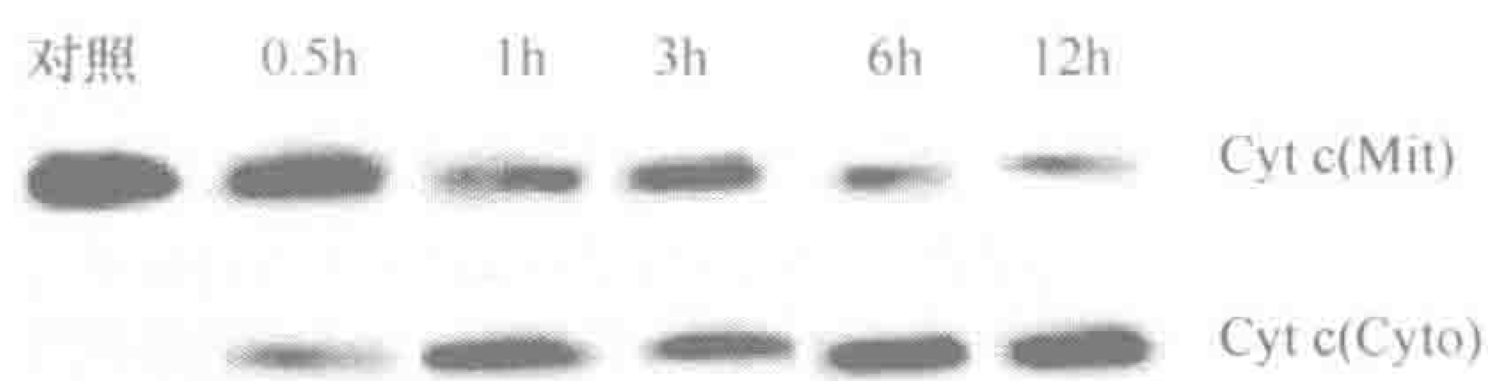


图 26-11　谷氨酸诱导海马神经元线粒体中细胞色素 c 释放

也可用 ApoAlert™ Cell Fractionation Kit 把高度富集的线粒体蛋白质和其他胞质蛋白分开。ApoAlert™ Cell Fractionation Kit 的优点：该试剂盒无须超速离心，步骤简单、直接；适合检测人、小鼠和大鼠标本。

第五节　结　　语

细胞凋亡概念提出至今还不到 30 年的时间，但由于它在个体的正常发育和保证多细胞生物的健康生存过程中扮演着关键角色，以及细胞凋亡紊乱在病理学研究中的重要作用，引起了人们对其机制和组分的广泛而深入的研究，成为目前生命科学界最为热门的研究方向之一，随着这方面研究的持续升温，涌现出了大量新的技术和方法对细胞凋亡进行检测，其中不少已经有商品化的产品出现，大大加速了研究的进程。

除了以上介绍的几种较常用检测细胞凋亡的方法外，还有一些尚未被列入的检测方法，新的方法一定也将很快出现。尽管用于检测细胞凋亡的方法较多，但形态学观察，尤其是透射电镜观察仍具有不可替代的作用，只是其应用受到一定限制。在细胞化学检测方法中，迄今没有任何一种方法具有足够的敏感性和特异性，尤其在病理组织中要做出准确定量分析仍较为困难。单独使用一种方法检测易出现假阳性，由于标本和病变的特点，选择多种适当的方法进行综合检测，常可得到较准确结果。重要的是，要充分了

解各种方法的原理及应用范围，并对结果做出合理的分析和判断。随着对细胞凋亡认识的深化和有关技术的进展，相信更敏感、更特异的方法会不断面世，这对于细胞凋亡的研究将具有重要的促进作用。

（王青青　王晓健）

参考文献

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, et al. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. Neuron, 15 (4): 961～973.

Brown DG, Sun XM, Cohen GM. 1993. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. J Biol Chem, 268 (5): 3037～3039.

Huang TJ, Price SA, Chilton L, et al. 2003. Insulin prevents depolarization of the mitochondrial inner membrane in sensory neurons of type 1 diabetic rats in the presence of sustained hyperglycemia. Diabetes, 52 (8): 2129～2136.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 26 (4): 239～257.

Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. Cell, 88 (3): 355～365.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, et al. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods, 139 (2): 271～279.

Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. 1997. Advances in apoptosis research. Proc Natl Acad Sci USA, 94 (24): 12736～12737.

Seigneuret M, Devaux PF. 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. Proc Natl Acad Sci USA, 81 (12): 3751～3755.

Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. Science, 281 (5381): 1312～1316.

Zwaal RF, Schroit AJ. 1997. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. Blood, 89 (4): 1121～1132.

第二十七章　免疫组织化学技术

第一节　概　　述

一、免疫组织化学概念及基本原理

（一）免疫组织化学概念

免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）又称免疫细胞化学（immunocytochemistry），是指将显示剂（荧光素、酶、金属离子、同位素等）标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体特异性反应和组织化学的呈色反应，对相应抗原进行定位、定性及定量测定的一项技术。免疫组织化学技术将抗原-抗体反应的特异性和组织化学的可见性有机地结合在一起，借助光学显微镜、电子显微镜和（或）荧光显微镜等的显像和放大作用，检测各种抗原物质（如蛋白质、多肽、酶、激素、病原体以及受体等）的组织分布、表达丰度及细胞和亚细胞定位。

免疫组织化学技术本质上是一种染色及原位示踪技术，始于1941年微生物家A. H. Coons创立的免疫荧光方法，先后经历了20世纪60年代的免疫酶标抗体技术（Abakane，1963），70年代的酶抗酶复合物技术（Sternberger，1970），80年代的胶体金免疫标记技术和亲和标记技术（Hsu，1985）、原位分子杂交技术（Couwenhoren，1988）和原位PCR技术（Bagasrao，1993）的出现，使组织化学技术进入了杂交组织化学阶段，即可以利用核苷酸碱基配对特异的反应特性借助光镜或电镜在原位对生物体细胞或组织中的核苷酸定位、定性及定量。

（二）免疫组织化学基本原理

免疫组织化学是免疫反应和组织化学巧妙结合的产物，其一方面利用了免疫学基本原理——抗原与抗体的结合具有高度特异性的特性，另一方面借助了化学显色方法。通常先提取组织或细胞中的靶蛋白，作为抗原或半抗原免疫小鼠等实验动物，制备特异性抗体，再用这种抗体（第一抗体）作为抗原去免疫动物制备第二抗体，并用酶（常用辣根过氧化物酶）或生物素等偶联后，与前述抗原成分结合将抗原放大，由于抗体与抗原结合后形成的抗原-抗体免疫复合物是无色的，因此，还必须借助化学方法将抗原抗体反应部位显示出来（常用显色剂DAB显示为棕黄色颗粒）。通过抗原抗体反应和呈色反应，在显微镜下可清晰看见细胞内发生的抗原抗体反应产物，从而能够在细胞或组织原位确定待检抗原的分布、含量。组织或细胞中凡是能作抗原或半抗原的物质，如蛋白质、多肽、氨基酸、多糖、磷脂、受体、酶、激素、核酸及病原体等都可用相应的特异

性抗体进行检测。

免疫组织化学技术的发展与抗体技术的发展息息相关，自 1975 年 Kohler 和 Milstein 发明了单克隆抗体制备的杂交瘤技术后，免疫组化技术已从采用多克隆抗体转入了广泛应用单克隆抗体时代。随着新蛋白质的不断发现和抗体技术的不断进步，免疫组织化学技术的应用更加广泛。

二、免疫组织化学分类

根据标记抗体的种类，如抗体标记在酶［主要有辣根过氧化物酶（HRP）和碱性磷酸酶（AKP）］、荧光染料、铁蛋白、胶体金、放射性同位素等，可分为免疫酶法、免疫荧光法、免疫铁蛋白法、免疫金银法和放射免疫法等。

根据染色步骤可分为直接法（或称为一步法）和间接法（又分为二步、三步或多步法）；间接法较直接法提高了检测的灵敏度。例如，EPOS［增强聚合物一步法（enhanced polymer one-step staining）］法为一步法，LDP［酶标聚合物法（labeled dextran polymer）］法、ABC［卵白素-生物素复合物法（avidin biotin complex）］法、LSAB［酶标抗生物素蛋白链霉素生物法（labelled streptavidin biotin）］法、SABC［抗生物素蛋白链霉素-生物素复合物法（streptavidin biotin peroxidase complex）］法、EnVision［增强酶标聚合物系统（enhanced labelled polymer system）］法、CSA［催化放大信号法（catalyzed signal amplification）］法和 PAP［过氧化物酶-抗过氧化物酶法（peroxidase anti-peroxidase）］/APPAP［碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶法（alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase）］法属于间接法。

根据结合方式可分为抗原-抗体结合，如过氧化物酶-抗过氧化物酶（PAP）法和亲和连接，如卵白素（avidin）-生物素（biotin）-过氧化物酶复合物（avidin biotin complex，ABC）法、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接（SP）法等。

三、常用免疫组织化学方法

（一）免疫荧光方法

免疫组织化学技术始于 1941 年微生物家 A. H. Coons 创立的免疫荧光方法。Coons 首次将异氰酸荧光素标记肺炎球菌抗体，示踪了小鼠组织中的肺炎球菌。免疫荧光方法是利用抗原-抗体特异性结合的原理，先将已知抗体标上某种荧光素，以此作为探针检查细胞或组织内的相应抗原，若已知抗体和待检细胞或组织内的相应抗原结合，则抗原-抗体复合物中的荧光素受激发光的照射后即会发出一定波长的荧光，激发的荧光在荧光显微镜下观察，可确定待检细胞或组织中待检抗原的定位，进而还可进行定量分析。随着荧光素种类的不断丰富和免疫荧光技术特异性强、灵敏度高、快速简便等特点，该方法在临床病理诊断、检验及科学研究中应用非常广泛。

（二）免疫酶标方法

免疫酶标方法是继免疫荧光后，于 1967 年由 Nakane 将过氧化物酶作为标记物引

进免疫组织化学技术发展起来的。免疫酶标方法是先以酶标记的抗体与待检细胞或组织中的抗原作用，然后加入酶的底物，生成有色的不溶性产物或具有一定电子密度的颗粒，通过光镜或电镜，对细胞表面和细胞内的各种抗原成分进行定性、定位研究。该技术是目前最常用的免疫组织化学技术。本方法相较于免疫荧光技术有定位准确，对比度好，染色标本可长期保存，适合于光、电镜研究等优势。

随着酶标抗体的不断增加和标记方法的改进和创新，免疫酶标方法已经衍生出了多种，且该方法的特异性和灵敏度都在不断提高，操作也越来越简单、方便。

（三）免疫胶体金技术

免疫胶体金技术是以一种特殊的金属颗粒胶体金作为标记物。由 Faulk 和 Tayler 于 1971 年创立。胶体金是指金的水溶胶，它能迅速而稳定地吸附蛋白质，对蛋白质的生物学活性则没有明显的影响。因此，用胶体金标记一抗、二抗或其他能特异性结合免疫球蛋白的分子（如葡萄球菌 A 蛋白）等作为探针，就能对组织或细胞内的抗原进行定性、定位，甚至定量研究。由于胶体金有不同大小的颗粒，且胶体金的电子密度高，所以免疫胶体金技术特别适合于免疫电镜的单标记或多标记定位研究。由于胶体金本身呈淡至深红色，因此也适合进行光镜观察。如应用银加强的免疫金银法则更便于光镜观察。

四、免疫组织化学技术的特点

（一）原位性

免疫组织化学的第一特点就是它是在组织细胞成分原始位置上发生的化学反应，是在细胞膜、细胞质和（或）细胞核，甚至在某一个细胞器（如线粒体、内质网等）上发生的抗原-抗体反应，有明确的定位。

（二）显色反应

免疫荧光法是将各种荧光素标记抗体；免疫酶法是将酶标记抗体，底物显色；免疫胶体金技术是将胶体金标记抗体，借助荧光显微镜、光镜、电镜使抗原抗体反应由不可见或看不清变得清晰可见。

（三）形态、代谢和功能三结合

免疫组织化学是根据显色来判断抗原抗体反应，是一种形态学，但同时可以判定该抗原含量的多少、分布情况，一定程度上体现了待检抗原的功能作用。如通过标记不同类型的荧光素，同一组织标本可以区分 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T，甚至其分泌的细胞因子也可同时检测。

（四）定性、定位和定量三位一体

免疫组织化学技术是通过抗原-抗体特异性结合和显色反应判断结果，首先可以判定待检抗原是否存在或表达（定性），如果该抗原在组织和细胞中表达，进一步判定其

在细胞膜、细胞质、细胞核及亚细胞器的分布（定位），最后，利用计算机软件测定图像的积分光密度值，使定量成为可能。

（五）特异性强

免疫学的基本原理决定了抗原与抗体之间的结合具有高度特异性，因此，免疫组织化学从理论上讲也是组织细胞中抗原的特定显示，如角蛋白（keratin）显示上皮成分，LCA 显示淋巴细胞成分。只有当组织细胞中存在交叉抗原时才会出现交叉反应。

（六）敏感性高

在应用免疫组织化学的起始阶段，由于技术上的限制，只有直接法、间接法等敏感性不高的技术，那时的抗体只能稀释几倍、几十倍；现在由于 ABC 法或 SP 法的出现，使抗体稀释上千倍、上万倍甚至上亿倍仍可在组织细胞中与抗原结合，这样高敏感性的抗体抗原反应，使免疫组织化学方法应用越来越方便。

第二节 免疫组织化学的关键技术

免疫组织化学技术是一门综合性技术，除了必须具备优质、高效和特异性的各种标记的（荧光素、酶、金属离子、同位素等）一抗、二抗，灵敏的检测方法和稳定的显示系统外，细胞和组织标本的取材、固定、包埋、切片，以及抗原修复，消除内源性酶，及怎样防止染色过程中的脱片等环节亦至关重要，对免疫组织化学结果的影响不可忽视。本节主要介绍免疫组织化学技术中的细胞和组织的取材、固定、包埋、切片、抗原修复，以及内源性过氧化物酶消除的方法和操作过程中的注意事项。

一、细胞和组织取材

恰当的组织处理是做好免疫组化染色的先决条件，也是决定染色成败的内部因素，在组织细胞材料准备的过程中，不仅要求保持组织细胞形态完整，更要保持组织细胞的抗原性不受损或弥漫，防止组织自溶。如果出现自溶坏死的组织，抗原已经丢失，即使用很灵敏的检测抗体和高超的技术，也很难检出所需的抗原，反而往往由于组织的坏死或制片时的刀痕挤压，在上述区域易出现假阳性结果。

（一）细胞标本的取材

细胞标本的取材有以下 5 种方法。

1. 印片法

将新鲜组织标本沿病灶中心剖开，将病变区轻轻压于载玻片上，脱落的细胞便黏附在载玻片上，吹干或自然晾干后，立即浸入细胞固定液内 20～30min，取出后自然干燥，低温保存备用。主要应用于活组织检查标本和手术切除标本。印片法操作简便省

时，细胞抗原保存较好；缺点是载玻片上细胞分布不均，细胞重叠，并且载玻片上组织液较多，可能会影响标记结果。

2. 培养细胞的处理

根据培养细胞特性分别采用不同的方法。对某些贴壁生长的细胞，将处理好的盖玻片放到培养板的孔内，再将合适数量的细胞铺板，即可制备理想的细胞标本，取出后PBS清洗、固定、4℃保存备用。对于浮悬培养的细胞，可将细胞制成2×10^6个细胞/ml的细胞悬液，用细胞离心涂片器或注射针头式滴管涂布于载玻片上，自然干燥，固定液固定，低温保存备用。如待检物为组织液、分泌物、血液等，可在载玻片上做涂片，固定后4℃保存备用。

3. 穿刺涂片法

用细胞针穿刺吸取病变区内液体成分，如穿刺液较少，可直接涂抹在载玻片上，注意涂抹均匀。如穿刺液较多，细胞较丰富，可用洗涤法，即将穿刺液滴入盛有1～2ml Hank（或RPMI-1640）液的试管内，混匀后，以低速100*g*离心5～10min后，弃上清，将沉淀制成细胞悬液（1×10^6个细胞/ml），吸取1滴于载玻片上，轻轻涂抹或用离心涂片机制成涂片，自然晾干后固定。常用于实质器官的病变区，如肝、肾、肺、淋巴结、软组织等穿刺。穿刺法操作简便，细胞形态保持较好，但细胞分布不均匀。

4. 沉淀涂片法

主要用于脑脊液、胸水、腹水、尿液等体液多细胞少的标本。体液采取后，必须及时处理，不宜加固定剂。根据标本内细胞数量多少选用不同的处理方法：①细胞数量极多者，可吸取少量液体直接涂在载玻片上；②细胞数量少者，可将液体沉淀，然后取沉淀液以400*g*离心10min，弃上清，将细胞涂片或用离心涂片制成涂片，自然晾干后固定备用。

5. 离心涂片机法

将待涂片的细胞样品制成2×10^5～2×10^6个/ml的细胞悬液，吸取50～100μl加入涂片机内，200*g*离心2min后细胞就均匀地分布于载玻片上。

制备细胞涂片注意事项：①标本反复离心洗涤后，细胞黏附性降低，在染色过程中易脱片，因此，载玻片上应预先涂黏附剂；②为节省试剂和便于观察，应将细胞集中在0.6～1cm^2的圆圈内，细胞总数以10^5个为宜；③黏液丰富的标本，如痰液、胃液，未经特殊处理，一般不宜作免疫组织化学染色。

（二）组织标本的取材

组织标本主要来自手术切除标本、活检组织标本、动物模型标本和尸体解剖标本等。为了有效防止尸体解剖标本因组织自溶坏死造成抗原的丢失，最好在2h内尽快取材。

组织标本的取材常受各种因素的影响，因此取材时需注意：①组织要求离体后30min内浸入固定液，动物组织要求心脏还在跳动时取材，但比较大的手术标本如胃、

肺、肠等器官，最好先固定后取材；②所用的刀必须锋利，要一刀下去切开组织，不可反复切拉组织，以免造成组织的挤压；③取材部位要根据研究目的，观察部位而定，注意设置正确的对照组织；④组织块大小要适中，一般为 2.5cm×2.5cm×0.2cm，切记取材时组织块宁可面积大，千万不能厚的原则(也就是说组织块的面积可以大到3cm×5cm，但组织块的厚度千万不能超过 0.2cm，否则将不利于组织的均匀固定)。

为充分保存组织的抗原性，标本离体后应立即速冻进行冷冻切片，或用固定液固定，进行脱水、浸蜡、包埋。如暂不用制片，亦可贮于液氮或－70℃保存。

二、细胞和组织标本的固定

（一）目的和意义

1）防止组织细胞的死后变化，防止自溶和腐败，以保持组织细胞的固有形态。

2）使细胞内的蛋白质、脂肪、糖和酶等各种抗原成分转变成不溶性物质，以保持它原有的结构与生活时相仿。

3）防止细胞过度收缩或膨胀而失去其原有形态结构。

4）固定剂兼有硬化作用、使组织硬化、增加组织硬度、便于制片。

5）使组织中的各种物质沉淀和凝固起来而产生不同的折射率，造成光学上的差异，以便染色后易于鉴别和观察。

6）经过固定的组织能对染料产生不同的亲和力而着色清晰，便于辨认。

（二）固定剂的种类

可用于免疫组织化学的固定剂种类繁多，性能各异，可根据不同细胞组织标本的类型和特性选择不同类型的固定剂，目前常用固定剂简介如下。

1. 醛类固定剂

该类固定剂为双功能交联剂，使组织-蛋白质之间相互交联，从而使抗原保存于原位，特点是对组织穿透性较强，收缩性较小。对 IgM、IgA、J 链、κ 链和 λ 链的标记效果很好，背景清晰，是最常用的固定剂。

1）10％中性缓冲福尔马林（甲醛原液 10ml，pH7.4 0.01mol/L PBS 90ml）。

2）10％钙-福尔马林（甲醛原液 10ml，饱和碳酸钙 90ml）。

3）10％多聚甲醛磷酸缓冲液（多聚甲醛 40g，pH7.4 0.1mol/L PBS 500ml，两者混合加热至 60℃，搅拌并滴加 1mol/L NaOH 至透亮为止，冷却后补加 PBS 至 1000ml。

2. 丙酮及醇类固定剂

该类固定剂是最早使用的固定剂，其作用是沉淀蛋白质和糖类，对组织穿透性强，保存抗原的免疫活性较好，但醇类对低分子蛋白质、多肽及胞质内蛋白质的保存效果较差，解决的办法是和其他试剂混合使用，如加冰乙酸、乙醚、氯仿、甲醛等。

1）丙酮的组织穿透性和脱水性更强，常用于冰冻切片及细胞涂片的后固定，保存抗原较好，平时 4℃ 低温保存备用，临用时，只需将涂片插入冷丙酮内 5～

10min，取出后自然干燥，低温冰箱保存备用。

2）Clarke 改良固定剂（100% 乙醇 95ml，冰乙酸 5ml），用于冰冻切片的后固定。

3）乙醚（或氯仿）与乙醇等量混合液。对组织穿透性极强，即使涂片上含较多的黏液，固定效果仍较好，是理想的细胞固定液。

4）AAF 液（95%～100%乙醇 85ml，冰乙酸 5ml，甲醛原液 10ml）。

以上介绍的固定液是最常用的，当前用于免疫组织化学的固定剂种类繁多，在此就不一一列出，但迄今为止，尚无一种标准固定液可用于各种不同的抗原固定。不同的抗原和标本需经过反复试验，选用最佳固定液，选择最佳固定液的标准是：①能够最好地保持细胞和组织的形态结构；②最大限度地保存抗原的免疫活性。一些含重金属的固定液在免疫组化技术中是禁用的。中性福尔马林（或多聚甲醛）是适应性较广泛的固定液，但固定时间不宜过长。必要时，可进行多种固定液比对，从中选出某一组织和抗原最理想的固定液。

（三）组织固定时注意事项

1）应尽快固定取材的组织，力求保持组织新鲜，勿使其干燥。

2）组织块不能过大过厚，尤其厚度不能超过 0.3cm。

3）固定液用量一定要充足，一般体积需大于组织 20 倍以上，否则会造成组织中心固定不良。

4）组织固定后应充分水洗，除去固定液，以减少固定液造成的人为假象。

5）固定时间最好以完全浸透为宜（12～72h），固定时间过长亦会影响染色效果。

三、组织脱水、透明和浸蜡

由于石蜡不溶于水和醇类试剂，只溶解于二甲苯类试剂中。因此，组织标本经固定后仍含有大量水分，需用乙醇类试剂进行脱水（脱水），脱水完成后，组织内含有大量的乙醇，还必须用能溶解乙醇的二甲苯来置换（透明），最后经浸蜡和包埋，组织细胞内被大量石蜡支撑，方能制备组织石蜡切片。故组织标本经固定后，需循序进行脱水、透明、浸蜡和包埋等过程处理。常用的脱水剂有：乙醇、丙酮、正丁醇、叔丁醇、环乙酮、松脂醇；常用的透明剂有：二甲苯、甲苯、苯、香柏油、苯甲酸甲酯、氯仿、冬青油、苯胺油。整个操作过程中掌握的原则是，脱水透明应充分但不能过头；浸蜡时间要够，但温度不能高（浸蜡及包埋石蜡温度不要超过 65℃），否则造成组织的焦脆使组织切片困难，即使能切片，也使切片不能完好平整，染色过程中极易脱片，对免疫组化染色抗原的定位及背景都不利，所以脱水和透明的时间不宜过长。不同类型组织的脱水、透明和浸蜡条件略有不同（表 27-1），并总结如下。将浸蜡后的标本从蜡缸中取出后，进行石蜡包埋。包埋好的标本即可进行切片。

表 27-1 组织脱水、透明、浸蜡程序

	液缸号	液体种类	处理时间	处理温度
脱水	1	75%乙醇	30～120min	室温
	2	85%乙醇	30～120min	室温
	3(Ⅰ)	95%乙醇	2h	室温
	4(Ⅱ)	95%乙醇	2h	室温
	5(Ⅲ)	95%乙醇	过夜	室温
	6(Ⅰ)	无水乙醇	30～60min	室温
	7(Ⅱ)	无水乙醇	30～60min	室温
	8(Ⅲ)	无水乙醇	60～120min	室温
透明	9(Ⅰ)	二甲苯或氯仿	15min	室温
	10(Ⅱ)	二甲苯或氯仿	15min	室温
	11(Ⅲ)	二甲苯或氯仿	15min	室温
浸蜡	12(Ⅰ)	石蜡	30min	60℃
	13(Ⅱ)	石蜡	1～2h	60℃
	14(Ⅲ)	石蜡	2～3h	60℃

1）较大动物组织（如狗、兔、小儿尸检组织）：75%乙醇 30～120min，85%乙醇 30～120min，95%乙醇Ⅰ 2h，95%乙醇Ⅱ 2h，95%乙醇Ⅲ过夜，无水乙醇Ⅰ 30～60min，无水乙醇Ⅱ 30～60min，无水乙醇Ⅲ 60min～120min，二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ和二甲苯Ⅲ各 15min（可视观察结果而定），石蜡Ⅰ 30min，石蜡Ⅱ 1～2h，石蜡Ⅲ 2～3h。

2）小动物组织脱水、透明和浸蜡时间：75%乙醇 30min，85%乙醇 30min，95%乙醇Ⅰ 1h，95%乙醇Ⅱ 1h，95%乙醇Ⅲ过夜或 2h，无水乙醇Ⅰ、无水乙醇Ⅱ和无水乙醇Ⅲ各 30min，二甲苯Ⅰ 15min，二甲苯Ⅱ 10min，二甲苯Ⅲ 10min（肉眼观察），石蜡Ⅰ 30min，石蜡Ⅱ 30min，石蜡Ⅲ 1～2h。

3）活检或手术切除标本的脱水透明和浸蜡时间：75%乙醇 30min，85%乙醇 1h，95%乙醇Ⅰ 1h，95%乙醇Ⅱ 1h 和 95%乙醇Ⅲ 4h 或过夜，无水乙醇Ⅰ 30min，无水乙醇Ⅱ 1～2h 和无水乙醇Ⅲ 4h，二甲苯Ⅰ 30min，二甲苯Ⅱ 30min 和二甲苯Ⅲ 1h。

四、组织切片技术

（一）玻片处理

组织切片主要有石蜡切片和冰冻切片。组织切片抗原修复过程中，由于高温、高压、辐射等诸多因素的影响，极易造成脱片，为保证免疫组织化学实验的正常进行，要求在贴片前对载玻片作适当处理，必须在清洗干净的玻片上进行黏合剂的处理以防脱片。

1. 载玻片的清洁

市售载玻片需经清洁液泡 24h，流水冲洗，系列乙醇浸泡，晾干涂胶等处理。

2. 常用组织切片黏合剂

1) Poly-L-Lysine（多聚左旋赖氨酸）。一般采用相对分子质量 30 000 左右的 0.5%多聚赖氨酸最好，也可用试剂公司出售的其浓溶液以 1∶10 去离子水稀释。方法是将玻片浸泡其中，倾尽余液，在 60℃温箱中烤干备用，此方法的优点是可以用于多种组织化学、免疫组织化学及分子学检测中的应用，粘贴效果最好，但价格稍贵。

2) 明胶硫酸铬钾。将 2.5g 明胶加热溶于 500ml 蒸馏水中，完全溶解冷却后加入 0.25g 硫酸铬钾搅匀充分溶解即可使用。方法是将玻片浸泡其中 2min，取出控尽液体入温箱中烤干备用。此法价格便宜、方法简单，任何实验都可以使用，特别适用于大批量的使用，但应注意，如果液体变蓝或黏稠状即停用。

3) APES（3-氨丙基-乙氧基甲硅烷）。此法必须现用现配。将洗净玻片入 1∶50 丙酮稀释的 APES 中，浸泡 20s，取出稍停再入丙酮或蒸馏水中刷去末结合的 APES 晾干即可。用此方法粘合的玻片应垂直烤片不能平烤，否则组织片中易出现气泡。

4) Histogrip™。将洗净的玻片放入以 1∶50 比例丙酮稀释的 Histogrip 液中，停留 1～2min，然后用双蒸水快速清洗 3 次，室温干燥或 60℃烤箱烘烤 1h，装盒备用。

（二）冷冻切片

冷冻切片是最常用的一种切片方法。优点是能够较完好地保存多种抗原的免疫活性，尤其是检测细胞表面抗原时应用冰冻切片效果更佳。新鲜的组织及已固定的组织亦可作冰冻切片。冰冻时，组织中的水分易形成冰晶，往往影响抗原定位。可以采取以下措施减少冰晶的形成。①干冰-丙酮（乙醇）法：将 150～200ml 丙酮（乙醇）装入小保温杯内，逐渐加入干冰，直至饱和呈黏稠状，再加干冰不再冒泡时，温度可达－70℃，用一小烧杯（50～100ml）内装异戊烷约 50ml，再将烧杯缓慢置入干冰丙酮（纯乙醇）饱和液内，至异戊烷温度达－70℃时即可使用。将组织（大小为 1cm×0.8cm×0.5cm）投入异戊烷内速冻 30～60s 后取出，或置恒冷箱内以备切片，或置－80℃低温冰箱内贮存。②液氮法：将组织块平放于软塑料瓶盖或特制小盒内（直径约 2cm），如组织块小可适量加 OCT 包埋剂浸没组织，然后将特制小盒缓缓平放入盛有液氮的小杯内，当小盒底部接触液氮时即开始气化沸腾，此时小盒保持原位切勿浸入液氮中，10～20s 组织即迅速冰结成块。取出组织冰块立即置入－80℃冰箱贮存备用，或置入恒冷箱切片机冰冻切片。③将组织置于 20%～30%蔗糖溶液 1～3d，利用高渗吸收组织中水分，减少组织含水量。

影响冰冻切片的因素较多，因此，技术难度较大，选择好的冰冻切片机是保证切片质量的关键。目前冰冻切片机有两类：①恒慢冰冻切片机（Cryastat）：是较为理想的

冰冻切片机，目前型号很多，但其基本结构是将切片机置于－30℃低温密闭室内，故切片时不受外界温度和环境影响，可连续切薄片至2～6μm，能够完全满足免疫组织化学标记要求。②开放式冰冻切片机：包括半导体制冷切片机和甲醇制冷切片以及老式的CO_2、氯乙烷等冷冻切片机。切片时暴露空气中，温度不易控制，切片技术难度大，在高温季节，切片更加困难，且切片厚8～15μm，不适合连续切片。冰冻切片后如暂不染色，必须吹干，贮存低温冰箱内，或进行短暂预固定后贮存冰箱保存。

（三）石蜡切片

石蜡切片优点是组织结构保持良好，能切连续薄片，组织结构清晰，抗原定位准确。石蜡切片为常规制片技术，切片机多为轮转式，切片厚度为2～7μm，应用范围较广，不影响抗体的穿透性，染色均匀一致。但由于甲醛固定、有机溶剂和包埋剂对组织抗原有一定的损害及遮蔽，使抗原特征发生改变，故需进行适当的抗原修复处理。

切片如需长期贮存，可存放于4℃冰箱内备用。

五、石蜡切片脱蜡至水

冰冻切片从低温冰箱中取出，晾干或电吹风吹干后可直接进行免疫组化标记。石蜡切片需经脱蜡至水后方能进行免疫组化标记。常规程序是：二甲苯Ⅰ 10min，二甲苯Ⅱ 10min，二甲苯Ⅲ 10min，无水乙醇2min，95%乙醇2min，85%乙醇2min，75%乙醇2min，流水冲洗。

六、内源酶及非特异性背景着色的消除

酶法免疫组织化学染色通常是由过氧化物酶来标记抗体，其工作原理是过氧化物酶作用于催化底物，使底物显色，根据颜色的有无、深浅和分布对靶抗原进行定性、定量和定位；而免疫组织化学标本一般均为生物体组织，其本身含有一定量的内源酶和内源性生物素，这些组织中存在的内源性酶也同样能催化底物使其显色，这就影响免疫组织化学的特异性，所以在标记抗体的过氧化物酶进入组织切片之前就应设法将组织内的内源性各种酶灭活，以保证免疫组织化学染色在特异性情况下进行。

（一）内源性过氧化物酶的消除方法

去除内源性过氧化物酶一般采用3% H_2O_2水溶液，能够去除大部分内源性过氧化物酶，即使有些血细胞在显色后也出现棕黄色反应，但由于其形态结构与组织细胞不同，也易鉴别，并且此方法比较通用易操作，但应注意H_2O_2的浓度不能过高，一般为3%～5%；时间不宜过长，最好室温10min。其他的还有3%苯肼溶液37℃处理1h；0.075%盐酸甲醇液处理30min；0.5%过碘酸处理10min，经洗后1%硼酸钠处理10min；或用20～100mol/L抗坏血酸处理30～60min等方法。

（二）内源性碱性磷酸酶的消除方法

最常用的灭活碱性磷酸酶方法是将左旋咪唑（24mg/ml）加入底物液中并保持pH

为 7.6～8.2，能除去大部分内源性碱性磷酸酶，对于仍能干扰染色的酸性磷酸酶可用 0.05mol/L 酒石酸抑制。

（三） 内源性生物素的消除方法

正常组织细胞如肝、脾、肾、脑，皮肤等组织中亦含有生物素。在应用生物素试剂的染色中，内源性生物素容易结合卵白素，形成卵白素-生物素复合物，导致假阳性，所以在采用生物素方法染色前，将组织切片先用 25μg/ml 卵白素孵育 15min，PBS 洗 10min，移至生物素饱和液中处理 15min，使其结合位点饱和，可以消除内源性生物素的活性，避免出现假阳性。

（四） 非特异性背景着色抑制方法

最常见的非特异性背景着色情况是抗体吸附到组织切片中高度荷电的胶原和结缔组织成分上。为了防止这种现象，最好用特异性抗体来源相同的动物灭活的非免疫血清，在抗体孵育之前进行处理以封闭荷电点，防止特异性抗体与之结合。通常采用 2%～10%羊血清或 2%牛血清白蛋白在室温下作用 10～30min。但需注意此种结合往往不牢固，因此最好孵育后不要冲洗，倾去余液直接加一抗。通常多克隆抗体容易产生背景着色，可采用含 1%非免疫血清的 pH7.4 的 PBS 液稀释抗体。

七、抗原修复

经甲醛固定的部分组织细胞，因固定过程中可能会形成醛键或羧甲基而封闭部分抗原决定簇，使免疫组化标记敏感性明显降低，因此在染色前，有些抗原需进行修复或暴露。

抗原修复方法可分为化学方法和物理方法。化学方法是以酶消化方法，常用胰蛋白酶及胃蛋白酶，配制浓度与消化时间要适度。常用的物理方法有单纯加热、微波处理和高压加热。在选用这 3 种加热法时，浸泡切片的缓冲液的离子强度和 pH、加热的温度和时间均影响着抗原修复效果。

（一） 化学试剂抗原修复法

1. 胃蛋白酶（pepsin）消化法

该法主要用于细胞间质或基底膜抗原的修复。

1） 切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。

2） 0.3% H_2O_2 甲醇处理切片 10min。

3） 自来水洗，蒸馏水洗。

4） PBS 冲洗，1min×3 次。

5） 滴上配制好（0.4g 胃蛋白酶溶于 0.1mol/L HCl 水溶液中）或商品化的胃蛋白酶，37℃作用 30min。

6） PBS 冲洗，2min×3 次。

7） 后按选择好的免疫组化该法进行染色。

2. 胰蛋白酶（trypsin）消化法

该法主要用于细胞内抗原的修复。

1）切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。

2）0.3% H_2O_2 甲醇处理切片 10min。

3）自来水洗，蒸馏水洗。

4）PBS 冲洗，1min×3 次。

5）滴上自配的［0.1g 胰蛋白酶加入到 0.1%pH7.8　$CaCl_2$（无水）水溶液中溶解］或商品化的胰蛋白酶，37℃作用 10min。

6）PBS 冲洗，2min×3 次。

7）后按选好的免疫组织化学染色方法进行染色。

除此之外，还有几种酶，如链霉蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶等也可被用来消化石蜡切片，其用法与上述基本一样。

应用酶来消化切片，主要是根据抗体的要求来进行的，否则都应用物理化学试剂抗原修复法来进行。

（二）物理化学试剂抗原修复法

1. 真空负压抗原修复法

这是一种操作简单，效果特佳，温度恒定，能一次性处理大量切片的方法。

1）切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。

2）0.3% H_2O_2 甲醇真空负压处理 5min。

3）自来水洗，蒸馏水洗。

4）0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液（pH6.0），真空负压干燥箱预先调至 95℃，真空负压处理 10min。

5）待修复液温度降至室温后，PBS 洗 3 次，随后按选好的免疫组织化学染色方法进行染色。

2. 微波辐射抗原修复法

该法的特点是产热迅速，容易操作，也容易引起抗原修复液的沸腾，使用微波炉时禁止使用金属性的器皿，以防引起失火或爆炸。将切片放入修复液中微波加热使温度在 96℃左右，计时 10min，在微波炉中停留 2min，室温自然冷却，PBS 洗 3min×3 次。

1）切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。

2）0.3%H_2O_2 甲醇处理 10min。

3）自来水洗，蒸馏水洗。

4）0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液（pH6.0），于微波炉内微波辐射 10min。

5）待修复液温度降至室温后，PBS 洗 3 次，随后按选好的免疫组织化学的染色方法进行染色。

3. 高压抗原修复法

将修复液在高压锅中煮沸，切片插在染色架上，放入锅中（要使修复液淹没切片）

开始喷气时盖上压力阀。计时 2min，冷水冲至室温取出切片，PBS 洗 3min×3 次。该法被应用于一些较难修复的抗原，经多次实验认为效果不错。

1）切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。

2）0.3%H_2O_2 甲醇处理切片 10min。

3）自来水洗，蒸馏水洗。

4）切片放入抗原修复液容器中，将容器放入高压锅中加热至沸腾。盖上压力阀至喷汽后持续 1～4min。

5）待修复液恢复至室温后，PBS 洗涤 3 次，随后按选好的免疫组织化学染色方法进行染色。

（三）抗原修复时注意事项

1. pH 的应用范围及选择

抗原修复液的 pH 非常重要，有效的抗原修复 pH 要比修复液的化学成分更重要，同样的修复液随着 pH 的升高染色的强度逐渐增强，但最佳 pH 范围为 6.0～10.0，对于大多数抗原这个范围的 pH 都能进行有效的修复，有些抗体（如 Ki-67、ER）则在 pH1.0～3.0 和 pH6.0～8.0 更为有效。

至今为止，大家公认的最好的抗原修复液是 pH6.0 的柠檬酸盐缓冲液和 pH8.0 的 EDTA 缓冲液。作为通用修复液碱性 pH 的修复液要比酸性的有效，而对固定很长时间旧的存档组织，酸性 pH 的修复液则优于碱性的修复液，所以两种抗原修复液可作为相互替补的进行抗原修复。

2. 抗原修复时应选择最佳温度

70～90℃的温度对未经固定的蛋白质可发生变性，但经福尔马林固定的蛋白质，温度必须达 92℃以上方能使其变性。研究结果显示，温度为 92～98℃是合适的，95℃效果最好。

抗原修复时有效温度所需持续时间需根据设备条件进行调整。例如，真空负压抗原修复法，当达到预定的温度和所需的负压（66.7kPa）后可持续 5～10min，微波辐射抗原修复法温度不好控制，抗原修复液容易沸腾，如果切片附贴任凭其沸腾持续 5～10min。如果切片附贴很牢固，为了防止脱片，一发现抗原液已沸腾，即可关掉电源，待温度下降后，又可重开电源。如此反复数次，使之持续 10min。应用高压抗原修复法，当发现抗原修复液沸腾后，加上压力阀，出现喷气后，可持续时间达 2～4min。

3. 抗原修复液必须遵循自然降温规律，否则效果不好或达不到抗原修复的目的

抗原修复持续时间过后，取出放于室温中让其慢慢地降温，绝不能为了争取时间，强行用冰块或冷水令其降温。这是因为当高温中的抗原蛋白分子链脱离了其他的束缚或联结，要有一个自然环境让其自然放松下来，随着温度的降低，它们会慢慢地恢复原来的形态和构型。如果用冰块和冷水强行令其降温，松开后的蛋白质分子肽链突遇降温而固定下来，恢复不了原有的构型，达不到预想的效果。

4. 尽量使用足量的抗原修复液

应用于抗原修复的液体，一定要充足，防止切片干涸。用于抗原修复的切片，如果由于液体少而导致切片的干涸，则应丢弃切片，因为热干涸的切片中的抗原是没办法补救的，因它是一种不可逆的现象。据实验认为，用于微波辐射抗原修复的液体，量大可多至1000ml。应用大量的抗原修复液时，由于它的量较大，可延缓了液体的沸腾时间，增加了切片受微波辐射的量，对抗原修复将达到彻底。

第三节　酶免疫组织化学染色

一、常用染色方法

目前常用的免疫组织化学染色方法很多，可以分为直接法和间接法两种。直接法是将酶等标记物直接标记在特异性第一抗体上，该抗体与组织细胞中存在的靶抗原结合即可显色；间接法是将酶等标记物标记在第二抗体或第三抗体（复合物）上，该方法是将特异性第一抗体先与组织细胞中的靶抗原结合，在将标记的第二抗体与第一抗原-抗体复合物结合，然后用显色剂显色；如标记物是标记在第三抗体上，则第二抗体与第一抗体结合后，再用标记的第三抗体（复合物）与第二抗体结合，最后用显色剂显色。常用的免疫组化染色方法有：EPOS为直接法，LDP、PAP/APPAP、LSAB（S-P）、SABC、EnVision和CSA属于间接法。

（一）EPOS法

增强聚合物一步法（enhanced polymer one-step，EPOS）是利用酶标聚合物技术，将辣根过氧化物酶（HRP）标记在葡聚糖聚合物上，再与一抗交联形成EPOS一抗。EPOS一抗直接与组织细胞特异抗原结合，EPOS一抗中的HRP与底物显色剂显色。EPOS法具有敏感、省时、即用、背景低等特点。

步骤

1）石蜡切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。

2）3% H_2O_2 水溶液孵育10 min。

3）PBS洗5min。

4）加EPOS/HRP一抗孵育15～60min。

5）PBS洗5min×3次。

6）DAB-H_2O_2显色1～5min。

7）水洗、复染，常规脱水透明，封片。

（二）ABC法

卵白素-生物素复合物（avidin biotin complex，ABC）法是根据卵白素和生物素具有高亲和力的生物学特性，用生物素与过氧化物酶结合获得生物素化过氧化物酶，此生

物素化过氧化物酶再和加入的卵白素形成卵白素-生物素-过氧化物酶复合物，即ABC复合物。ABC法为三步法，二抗为生物素化的IgG，其中的Fab段与一抗结合，生物素与ABC复合物中的卵白素结合，最后通过ABC复合物上的过氧化物酶参与显色反应形成有颜色的不溶性沉淀物。由于卵白素和生物素的亲和力很强，故ABC法比较敏感。

步骤

1）石蜡切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。

2）3%H_2O_2 水溶液孵育10min。

3）PBS洗5min。

4）加非免疫性动物血清室温下孵育15min。

5）加一抗孵育60min。

6）PBS洗5min×3次。

7）加生物素化二抗孵育30min。

8）PBS洗5min×3次。

9）加ABC-HRP复合物孵育30min。

10）PBS洗5min×3次。

11）DAB-H_2O_2显色1～5min。

12）水洗、复染，常规脱水透明，封片。

（三）SP法

SP法（streptavdin-peroxidase-biotin）：国外其他公司亦将其注册为酶标抗生物素蛋白链霉素-生物素（labelled streptavidin biotin，LSAB）法和抗生物素蛋白链菌素-生物素复合物（streptavidin biotin peroxidase complex，SABC）法。用链霉素生物素蛋白代替ABC复合物中的卵白素蛋白即形成SP法。

SP法染色步骤

1）石蜡切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。

2）3%H_2O_2 水溶液孵育10min。

3）PBS洗5min。

4）加非免疫性动物血清室温下孵育15min。

5）加一抗孵育60min或4℃过夜。

6）PBS冲洗3min×3次。

7）加生物素化二抗孵育15～30min。

8）PBS冲洗3min×3次。

9）加HRP标记的抗生物素蛋白链菌素（SA-HRP）孵育15～30min。

10）PBS冲洗3min×3次。

11）DAB-H_2O_2或AEC显色3～10min。

12）自来水冲洗，苏木素复染，0.1%HCl分化，0.1%氨水或PBS冲洗返蓝。

13）如果用DAB显色，则切片经过梯度乙醇脱水干燥，二甲苯透明，中性树胶封

固，如果用 AEC 显色，则切片不能经乙醇脱水，而直接用水性封片剂封片。

SABC 法染色步骤

1）石蜡切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。
2）3% H_2O_2，室温封闭 10min。
3）PBS 冲洗 5min。
4）加非免疫性动物血清室温下孵育 15min。
5）加一抗，室温孵育 1h 或者 4℃过夜或者 37℃ 1h（4℃过夜后在 37℃复温 45min）。
6）PBS 洗 5min×3 次。
7）加生物素化二抗，20～37℃孵育 20min。
8）PBS 洗 5min×3 次。
9）加试剂 SABC-HRP 复合物，20～37℃孵育 20min。
10）PBS 洗 5min×3 次。
11）DAB-H_2O_2 显色 1～5min（镜下掌握显色程度）。
12）蒸馏水洗。苏木素复染 2min，盐酸乙醇分化。
13）脱水、透明、封片、镜检。

（四）LDP 法

酶标聚合物法（labelled dextran polymer，LDP），如 EnVision System，是应用酶标聚合物技术，先将辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶（AKP）标记在葡聚糖聚合物上，再与二抗交联形成 EnVision 二抗。其基本原理是特异性的一抗与组织细胞抗原结合后，再用 EnVision 二抗与抗原-抗体复合物中的一抗结合，最后通过 EnVision 二抗上的酶参与显色反应。EnVision 检测系统为一种两步法免疫组化技术，又称为 ELPS 法。其他的 EliVision 和 PowerVision 检测试剂盒亦属于酶标聚合物法。该方法具有敏感、省时、方便、背景低等特点。EnVision 与 SP、ABC 显色比较，具有很多优势：① 敏感性高，定位好。EnVision 系统是将第二抗和酶连接成一个多聚体（即 EnVision）直接放大信号 40～50 倍，再与已经结合的一抗反应，最后显色剂显色。采用该法可将一抗稀释度提高 1～2 倍，尤其对抗原表达较弱组织。也有人认为 SP 法敏感度比 EnVision 高 1～2 倍，但 SP 法不宜用于富含亲生物素物质的组织。② 特异性高。EnVision 法是多聚物上连接二抗和酶，在组织中不含有这种多聚物，从而避免了组织中生物素的干扰。在含生物素较丰富的组织中，用 EnVision 法比较好。除血细胞较丰富的组织和坏死组织外，其实可省略内源性过氧化物封闭步骤。③ 省时。染色步骤为两步，且二抗孵育时较短。

步骤

1）石蜡切片脱蜡至水，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。
2）预处理组织切片（参考一抗具体说明书）。
3）蒸馏水漂洗，置于 TBS 中。

4）阻断内源性过氧化物酶（仅用于 EnVision TM/HRP）。

5）蒸馏水漂洗，置于 TBS，10min。

6）一抗孵育 10～30min。

7）TBS 漂洗 10min。

8）EnVision TM/HRP 孵育 10～30min。

9）TBS 漂洗 10min。

10）色源底物溶液孵育 10 min。

11）蒸馏水漂洗。

12）复染及封片。

（五）CSA 法

催化信号放大（catalyzed signed amplification，CSA）法是应用一种放大试剂生物素化酪胺，与抗生物素蛋白链菌素-生物素-过氧化物酶复合物（streptavidin biotin-HRP）连接，在过氧化物酶作用下形成大量的生物素沉积物，再加入抗生物素蛋白链菌素-HRP，过氧化物酶与生物素沉积物形成大量的过氧化物酶聚合物，聚合的过氧化物酶与显色剂发生显色反应。由于该法应用了极其敏感的显色放大系统，使信号不断放大，因此灵敏性非常高，特别适用于石蜡切片较难出结果的组织。

步骤

1）石蜡切片脱蜡、水化，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。

2）3% H_2O_2 水溶液孵育 10min。

3）PBS 洗 5min。

4）加封闭液孵育 5min。

5）加一抗孵育 15～60min。

6）PBS 洗 5min×3 次。

7）加生物素化二抗孵育 15min。

8）PBS 洗 5min×3 次。

9）加 SABC-HRP 复合物孵育 15min。

10）PBS 洗 5min×3 次。

11）加催化信号放大试剂孵育 15min。

12）PBS 洗 5min×3 次。

13）加过氧化物酶标记的抗生物素蛋白链菌素（SA-HRP）孵育 15min。

14）PBS 洗 5min×3 次。

15）DAB-H_2O_2显色 1～5min。

16）水洗、复染，常规脱水透明，封片。

（六）PAP 法

过氧化物酶抗过氧化物酶（peroxidase anti-peroxidase，PAP）法属于非标记抗体法。该法主要通过制备具有高特异性的抗过氧化物酶抗体，并在抗酶抗体中加入过量的

过氧化物酶，使过氧化物酶充分结合到抗酶抗体上形成可溶性的 PAP 复合物。PAP 法为三步法，主要原理是通过第二抗体的 IgG 的两个 Fab 片段，一个与特异性一抗结合，另一个与 PAP 复合物结合，最后通过 PAP 复合物上的酶参与显色反应形成有颜色的不溶性沉淀物。

步骤

1）石蜡切片脱蜡、水化，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。
2）3% H_2O_2 水溶液孵育 10min。
3）PBS 洗 5min。
4）加非免疫性动物血清室温下孵育 15min。
5）加一抗孵育 60min。
6）PBS 洗 5min×3 次。
7）加二抗孵育 30min。
8）PBS 洗 5min×3 次。
9）加 PAP 复合物孵育 30min。
10）PBS 洗 5min×3 次。
11）DAB-H_2O_2或 ACE 显色 1～5min。
12）水洗、复染，常规脱水透明，封片。

（七）APAAP 法

碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶（alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase，APAAP）法也属于非标记抗体法。该法主要通过制备具有高特异性的抗碱性磷酸酶抗体，并在抗酶抗体中加入过量的碱性磷酸酶，使过碱性磷酸酶充分结合到抗酶抗体上形成可溶性的 APAAP 复合物。APAAP 法与 PAP 法的原理、操作等基本相同，只是在染色操作中无须 H_2O_2 消除内源性过氧化物酶的干扰，显色剂通常为固蓝、固红和 BCIP/NBT 等。

步骤

1）石蜡切片脱蜡、水化，冷冻切片和细胞涂片固定后水洗。
2）3% H_2O_2 水溶液孵育 10min。
3）PBS 洗 5min。
4）加非免疫性动物血清室温下孵育 15min。
5）加一抗孵育 60min。
6）PBS 洗 5min×3 次。
7）加二抗孵育 30min。
8）PBS 洗 5min×3 次。
9）加 APAAP 复合物孵育 30min。
10）PBS 洗 5min×3 次。
11）固蓝显色 37℃ 15～20min。
12）水洗、复染，甘油明胶封片。

（八）双重免疫酶标记染色

上述单标记只能对一种抗原进行定性、定量及定位分析，当需要明确两种抗原在同一组织细胞内的相互关系，就需要进行免疫组织化学的双重标记。当前解决此问题最简单的方法可以采用连续切片分别单标记，再通过连续切片同一细胞或结构的染色结果来判定两种抗原之间的关系。该方法对于较大的细胞组织比较适用，但对于形态较小或不同细胞间两种物质相互关系的定位，必须在同一切片上进行免疫组化的双重标记。双重免疫标记染色法是以酶催化不同底物呈现不同颜色产物标示同一切片内两种或两种以上抗原为理论基础建立起来的。常用的双重免疫标记法有单酶双底物法和双酶双底物法两种。

1. 常用标记酶与底物的配伍

单酶双底物法

HRP 的底物:DAB(棕色)和4CN(蓝色)；

HRP 的底物:ACE(红色)和4CN(蓝色)；

(AP) 碱性磷酸酶：AS-MX-坚固红（fast red，红色）和 AS-MX 坚固蓝（fast blue，蓝色）。

双酶双底物法

HRP 及其底物 DAB（棕色）和（AP）碱性磷酸酶及其底物 AS-MX-坚固蓝（蓝色）；

HRP 及其底物 4CN（蓝色）和（AP）碱性磷酸酶及其底物 AS-MX-坚固红（红色）。

2. 双酶双底物法操作举例

淋巴瘤轻链 κ、λ 的双重酶标记

1）石蜡切片常规脱蜡进水（若用含汞固定液固定的组织则需用 0.5%碘的 70%乙醇溶液脱汞 5min，经自来水洗后，以 2.5%硫代硫酸钠浸洗 1min，水洗）。

2）0.3% H_2O_2 甲醇液浸泡切片 30min，自来水洗涤，蒸馏水洗涤，加入 PBS (0.01mol/L pH7.2)。

3）滴加正羊血清 1∶10，湿盒，室温，10min，不洗。

4）加一抗（抗人 κ PcAb 与抗人 λMcAb 的混合液）1∶200，湿盒，37℃，45min 或更长。

5）PBS 洗，5min×3 次。

6）加二抗（GARG+GAMG 混合液 1∶200），湿盒，37℃，30min。

7）PBS 洗，5min×3 次。

8）加酶抗酶抗体复合物（兔 PAP＋鼠 APAAP 混合液 1∶100），湿盒，37℃，30min。

9）PBS 洗，5min×3 次。

10）过氧化物酶显色反应：以 DAB-H_2O_2 液显色 7～10min（镜下控制显色程度），PBS 洗涤，5min×3 次。

11）碱性磷酸酶显色反应：以萘酚 AS-MX-坚固蓝显色 10～15min（镜下控制显色程度），PBS 洗、自来水清洗。

12）缓冲甘油封片，光镜下观察。

二、染色结果判断

（一）免疫组织化学的结果判断

一种方法是对以检测结果阳性细胞指数来定性（如核抗原的标记），判断方法是以一个视野中的阳性细胞数与总细胞的百分比，再取10个相同视野算取平均指数。

另一种方法以染色阳性强度和阳性检出率相结合而定，一般阳性细胞数在0～25%为阴性，25%～50%为+，50%～75%为++，75%以上为+++。此种判定方法容易出现人为误差现象，最好能用图像分析系统进行结果检测定量分析更为准确。

（二）常见的抗原分布模式

1）细胞膜线性分布，大多数淋巴细胞标记的染色，如CD20、CD45RO。

2）细胞质内弥漫性分布，多数胞质型抗体，如细胞角蛋白（cytokeratin，CK）和波形蛋白（vimentin）等。

3）胞质内局限性点状阳性，如CD15抗体的染色。

4）细胞核周的胞质内分布，其判别要点是细胞核的轮廓被勾画得很清楚，如CD3多克隆抗体的染色。

5）细胞核阳性，如Ki-67及雌、孕激素受体蛋白ER、PR等。

一种抗体可同时出现细胞质和细胞膜的阳性表达，如EMA可呈膜性和胞质内弥漫性阳性反应；CD30抗体可同时呈膜性和胞质内点状阳性反应等。

（三）假阴性或假阳性因素及对策

1. 假阴性可能出现在

1）组织内待测抗原已被分解破坏，或抗原含量过低。

2）抗原被覆盖，多由于醛类固定剂的使用，使组织中的大分子蛋白借醛键形成交联而遮盖待检抗原。

3）抗体质量不佳或稀释度不当。

4）技术操作失误等。

2. 假阳性可能出现在

1）使用多克隆抗体易出现抗体与非待检抗原发生交叉反应，可能出现假阳性。

2）组织对抗体的非特异性吸附，特别是在有大片组织坏死或组织中有较多富于蛋白质的液体时容易发生假阳性。

3）内源性过氧化物酶的作用，在脾脏、骨髓及某些炎性病变组织的染色中易出现。

4）内源性碱性磷酸酶的作用，特别是肠黏膜上皮和肾近曲小管的刷状缘有高浓度的碱性磷酸酶，若处理不彻底，易出现假阳性结果。

5）判断失误，将肿瘤组织中残留的正常组织的免疫组织化学阳性信号误认为是肿

瘤的染色反应。

6）当肿瘤浸润破坏正常组织时，使被破坏的正常细胞质内的可溶性蛋白释放，后者被肿瘤细胞非特异吸附或吞噬，使瘤细胞出现该种抗原的阳性反应。

7）外源性和内源性色素的干扰。

3. 假阴性或假阳性对策——对照片的设置

正确使用各种对照是防止假阴性或假阳性的发生的关键。对照包括阴性对照、阳性对照和自身对照。在实际操作中，可用不含待检抗原的组织切片作为阴性对照，而用包含已知待检抗原的组织切片作阳性对照。观察染色结果时，应先观察对照组织的结果，如阳性对照组织中阳性细胞呈强阳性，阴性对照细胞呈阴性，背景没有非特异性染色，表明该次实验的试剂和技术操作准确无误，待检组织中的阴性或阳性结果就是可信的正确的。

1）阴性对照（空白对照）：第一抗体由 PBS 或非免疫血清取代。

2）阳性对照：用已知含有要检测抗原的切片作阳性对照。

3）自身对照：在同一切片上，应将不同组织成分中的阳性或阴性结果与检测的目的物对照比较。例如，actin、CD34 在正常组织中的血管壁肌层应为阳性，vimentin 可以间质细胞为对照，desmin 以血管壁及肌束为对照，S-100 蛋白以小神经末梢为对照等，如果应为阳性的组织是阳性，则免疫组织化学技术正确，如为阴性，则表明染色技术有问题或免疫试剂质量有问题。

4）回收实验阴性对照：已知抗原与相应的第一抗体混合，发生结合沉淀，再用此沉淀抗体复合物进行免疫组织化学实验，结果为阴性。

5）替代对照：用于第一抗体同种动物的血清或无关抗体代替第一抗体结果为阴性。

三、免疫组织化学操作要点及技巧

（一）固定

最好用 4％的多聚甲醛固定液。对于冰冻切片，甲醛固定有时比冰冻丙酮好；但对于不同的组织和抗原，可选用不同的固定液。有时候商品化的抗体会有比较适合的固定液，请于购置前注意说明书。

1）Bouin S 固定液：冰乙酸 50ml，甲醛 250ml，饱和苦味酸 750ml，其对组织的穿透力较强，固定较好，结构完整，因偏酸，对抗原有一定损害，且组织收缩明显，不适于组织标本的长期保存。

2）PLP 液：高碘酸钠-赖氨酸-多聚甲醛，适于固定富含糖类组织的石蜡切片，对超微结构及许多抗原的抗原性保存较好。

（二）组织脱水和透明

时间不能太长，否则在切片时容易碎片，切不完整。

（三）展片、烤片及蜡块保存

有些组织在切片后难以在水中展开，这时可适当地在水中加入几滴乙醇使展片容

易；烤片最好在60℃ 30min或37℃过夜，温度太高或时间太长，抗原容易丢失；蜡块及切片最好在4℃保存。poly-L-lysine（多聚赖氨酸），适合于需要酶消化、微波、高温高压的防脱片处理。如不行，可用双重处理（APES和poly-L-lysine）的切片。在以上两种条件都行不通的情况下，可用如下方法：切片在脱蜡前，放在APES 1∶50丙酮溶液中浸泡3min，晾干，即可进行下一步。

（四）抗原暴露

对于石蜡切片的免疫组织化学实验时，必须采用高温加热抗原修复，这将有助于暴露抗原决定簇，从而增加免疫组织化学染色的强度（不同抗体的最佳修复液，请参阅抗体说明书）。对于不同的组织，不同的抗原，不同的抗体，所采用的方法应不一样，可进行热修复、胰酶消化、既不修复也不消化。胶原还可以用胃蛋白酶消化等。

（五）染色

可通过延长封闭时间或用浓缩血清封闭，消除较强的非特异性染色；遵循“现用现配”的原则稀释抗体，对用PBS稀释的抗体务必当天使用；在抗体浓度、反应时间、反应温度等合适的条件下，如果背景依旧高，可采用含1‰ Tween-20的PBS洗涤，特别是在显色之前要多洗；显色时，一定要在显微镜下观察，注意控制背景；在苏木素复染后，可用碱性缓冲液（如PBS）或Na_2HPO_4的饱和溶液返蓝；在整个操作过程中，切片千万不能干燥，否则会有非特异性染色。

（六）拍照

1）更换样品时，除了调整焦距和视野外，显微镜上的其他部件都不能动。所有的样品必须一次拍摄完全。特别是在拍摄过程中，不能一会儿用高倍镜，一会儿用低倍镜，来回切换物镜。

2）数码相机必须设置为手动曝光，并且保持每张照片用同样的曝光条件，同样的曝光时间，同样的光圈。特别要注意的是，一定要将数码相机的自动白平衡功能关掉。

3）免疫组化切片一般染色不太深，因此拍摄出的照片颜色较浅。拍摄出的照片中空白部位应尽可能呈现纯白色。测量其灰度应在250左右。如果呈现淡蓝色，一般是相机自动白平衡在起作用。另外一个因素是显微镜灯光电压不正确。要使灯光本身的色温正确。既不偏黄，也不偏蓝。

第四节　荧光免疫组织化学技术

免疫荧光法是最早建立的免疫组织化学技术，免疫荧光法的基本原理是抗原-抗体特异性结合的原理，将已知的抗体或抗原分子标记上荧光素，当与其相对应的抗原或抗体起反应时，在形成的复合物上就带有一定量的荧光素，以此作为探针检查细胞或组织内的相应抗原，在荧光显微镜下就可以看见发出荧光的抗原-抗体结合部位，从而可确

定组织中某种抗原的定位，进而还可进行定量分析。由于免疫荧光技术特异性强、灵敏度高、快速简便，所以在临床病理诊断、检验中应用比较广。

荧光免疫组织化学技术既有抗原-抗体反应的高度特异性，又能在荧光显微镜下清晰地显示其形态，直观性强。该方法可用于组织学中抗原或抗体的定位，也可用于体液标本中抗原或抗体的定量检测。对于新鲜或陈旧标本，或污染杂菌的标本，只要处理得当，都不影响其结果判定。其主要缺点是荧光容易消退，难以制备永久性标本，非特异荧光的干扰常影响结果的判断。本法的另一局限性是需要有荧光显微镜才能观察结果。

一、荧光免疫组织化学技术分类

（一）直接法

用荧光素标记特异性抗体，将特异性荧光抗体直接滴加于待测标本上，直接与相应抗原反应。此法常用于细菌、病毒等病原微生物的快速检测和肾活检以及皮肤活检的免疫病理检查。本法操作简便、特异性高、非特异性荧光干扰因素少。缺点是敏感度偏低，而且每检查一种抗原需制备相应的特异性荧光抗体。

（二）间接法

用荧光素标记抗球蛋白抗体（抗抗体），待基质标本中的抗原与相应抗体（第一抗体）反应，再用荧光素标记的抗抗体（第二抗体）结合第一抗体，通过荧光现象检查抗原或抗体。此法常用于检测各种自身抗体。本法的敏感性高于直接法，而且制备一种荧光抗体可用于检测多种抗原或抗体。缺点是参与的因素多，易出现非特异性荧光，试验方法较麻烦，操作时间也较长。

（三）补体结合法

用荧光素标记抗补体抗体，待基质标本中的抗原与抗体反应后，加入补体，补体和抗原-抗体复合物结合。再加入荧光素标记的抗补体抗体，通过荧光现象检查抗原或抗体。本法敏感度高，制备一种荧光抗体可检测多种抗原或抗体，并且适用于任何动物的抗原-抗体系统。缺点是易出现非特异性荧光染色，并且每次试验都需要新鲜补体，操作复杂。

（四）双重标记或多重标记法

用两种荧光素（FITC 和 RB200）分别标记不同抗体，对同一标本进行荧光染色，若有相应的两种抗原同时存在，可同时显示两种荧光（黄绿色和橘红色荧光）。方法与直接法相同。本法主要用于同时观察细胞表面两种抗原的分布与消长关系，如区分末梢血或同一切片中 T 细胞和 B 细胞等。

二、常用的荧光素

荧光是指一个分子或原子吸收了给予的能量后即刻引起发光，停止能量供给，发光

也瞬时停止。可以产生明亮荧光的染料物质，称荧光素。目前主要常用于标记抗体的荧光素如下。

（一）异硫氰酸荧光素

异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）是一种呈黄色、橙黄色或褐黄色结晶粉末，性质稳定，在室温下能保存2年以上，在低温中可保存多年，易溶于水和乙醇。有两种异构体，相对分子质量为389.4。最大吸收光谱为490～495nm，最大发射光谱为520～530nm，呈现明亮的黄绿色荧光，在碱性条件下，FITC的异硫氰酸基在水溶液中与免疫球蛋白的自由氨基经碳酰胺化而形成硫碳氨基键，成为标记荧光免疫球蛋白，即荧光抗体。一个IgG分子上最多能标记15～20个FITC分子，是最常用的标记抗体的荧光素。

（二）四甲基异氰酸罗达明

四甲基异氰酸罗达明（tetrametrylrhodarnine isothiocyante，TRITC）是一种紫红色粉末，是罗丹明（rhodamine）的衍生物，性质较稳定。其最大吸收光谱为550nm，最大发射光谱620nm，呈橙红色荧光，与FITC的黄绿色荧光对比清晰，与蛋白质结合方式同FITC，常用于双标记示踪研究。

（三）得克萨斯红

得克萨斯红（Texas red）是一种褐色粉末状，易溶于有机溶剂，性质稳定，在4℃下能保存2年以上，最大吸收光谱为590～595nm，最大发射光谱为620～630mm，共有4种结构，常用的相对分子质量为625.15。

（四）其他荧光素

4-乙酰胺-4-异硫氰酸-2-硫酸芪（SITS）、7-氨基甲基香豆素（AMC）呈蓝色荧光，藻红素R（phycoerythrin-R），花青（Cyanine、Cy2、Cy3、Cy5和Cy7）详见第二十五章表25-1等。PE（藻红蛋白）：橙黄色575nm；PerCP（多甲藻黄素叶绿素蛋白）：深红色675nm；PI（碘化丙啶）：488nm波长的氩离子激光激发，橙红色620nm；APC（别藻青蛋白）：630nm波长的氦氖激光或红色二极管激光激发，红色660nm。

三、标本的制备

荧光免疫组织化学技术是根据组织细胞的待检抗原与相应的荧光抗体结合，并在激发光的作用下，发射一定波长的不同颜色的荧光，借助荧光显微镜可观察荧光的有无、强弱和分布，从而对待检抗原作定性、定量和定位判断。在这个过程中，标本制作是整个环节的关键。标本制作应力求保持抗原的完整性，并在染色、洗涤和包埋过程中不发生变性和溶解，也不能扩散至邻近细胞或组织间隙中。标本要求尽量薄些，以利抗原、抗体接触和镜检。

（一）标本的种类

1. 涂片和印片

如血液、脑脊液、体腔渗出液、细胞悬液及细菌培养物等均可均匀涂抹于载玻片上，待干燥固定后即可用。脑脊液、某些脏器（肝、脾、淋巴结等）、细菌菌落或尸体病变组织亦可把切面压印于载玻片上制成印片，经干燥固定后再染色。

2. 贴壁细胞

如用 A549 或 HeLa 等贴壁生长细胞，可将处理好的玻片放在培养板孔内，再将细胞悬液加入，待细胞在玻片上形成单层，固定后即可用于荧光染色。

3. 组织切片

与酶法免疫组化相似，亦可分为冷冻切片和石蜡切片两种。

1）冷冻切片：其优点是操作简单，能够使组织的抗原性最大量保存，自发荧光较少，特异荧光强，同时适用于不稳定的抗原，缺点是组织结构欠清晰。

2）石蜡切片：主要用于形态学研究，其优点是组织细胞的精细结构显现清楚，且组织标本易保存故可进行回顾性研究；但对抗原的保存量不如冷冻切片，并有组织自发荧光和非特异性荧光，需进行抗原修复等处理。

（二）标本的固定

固定标本一方面可以使细胞内的蛋白质凝固，终止细胞内的酶反应，防止细胞自溶，以保持细胞固有形态和结构；另一方面可以保存组织细胞的抗原性，防止标本脱落，除去阻碍抗体结合的类脂，使标本易于保存。

标本固定的原则是不能改变细胞的形态、损伤细胞内的抗原和细胞膜的通透性。通常蛋白质类抗原如血清蛋白和抗体，可用乙醇或甲醇固定；微生物抗原可用丙酮或三氯化碳固定；如需除去病毒的蛋白质外壳，则可使用胰蛋白酶；多糖类抗原用 10% 福尔马林固定或以微火加热固定。如有黏液物质存在，应用透明质酸酶等处理除去。类脂质丰富的组织进行蛋白质、多糖抗原检测时，需用有机溶剂（乙醚、丙酮等）处理除去类脂。

（三）标本的保存

标本经固定干燥后，最好立即进行荧光抗体染色及镜检。如必须保存时，则应保持干燥，置 4℃以下保存。一般细菌涂片或器官组织切片经固定后可保存一个月以上。但病毒和某些组织抗原标本抗原性丧失较快，数天后就失去其抗原性，故需在－20℃以下保存。

四、荧光抗体染色

（一）直接法

1. 染色

组织切片固定后，将切片放入湿盒内，滴加已稀释至合适浓度的荧光抗体（通常

1∶8或1∶16稀释，不能低于1∶20）于切片上，室温或37℃孵育30min。

2. 洗片

倾去存留的荧光抗体，将切片浸入pH7.4或pH7.2 PBS中洗两次，搅拌，每次5min，再用蒸馏水洗1min，除去盐结晶。

3. 封片和镜检

用50%缓冲（0.5mol/L碳酸盐缓冲液pH9.0～9.5）甘油封固、镜检。直接法比较简单，适合做细菌、螺旋体、原虫、真菌及浓度较高的蛋白质抗原如肾、皮肤的检查和研究。此法每种荧光抗体只能检查一种相应的抗原，特异性高而敏感性较低。

（二）间接法

1）切片或涂片固定后，置于染色湿盒内。

2）滴加稀释到合适浓度的未标记的特异性一抗于切片上，37℃孵育30min。

3）PBS洗，每次5min×2次，吹干。

4）滴加合适浓度的荧光标记的二抗于切片上，37℃孵育30min。

5）PBS洗，每次5min×2次，吹干。

6）缓冲甘油封固，镜检。

间接法只需制备一种荧光抗体可以检出多种抗原，敏感性较高，操作方法较易掌握，而且能解决一些不易制备动物免疫血清的病原体（如麻疹）等的研究和检查，所以已被广泛应用于自身抗体和感染病人血清的试验。

（三）补体法

材料与试剂

1）免疫血清60℃灭活20min，用Kolmers盐水做2倍稀释成1∶2，1∶4，1∶8等。补体用1∶10稀释的新鲜豚鼠血清，抗补体荧光抗体等，按下述的补体法染色。免疫血清补体结合的效价，如为1∶32则免疫血清应做1∶8稀释。

2）补体用新鲜豚鼠血清一般做1∶10稀释或按补体结合反应试管法所测定的结果，按2单位的比例，用Kolmers盐水稀释备用。Kolmers盐水配法：在pH7.4、0.1mol/L的磷酸缓冲盐水中，溶解$MgSO_4$的含量为0.01%浓度。

3）抗补体荧光抗体：在免疫血清效价为1∶4，补体为2U的条件下，用补体染色法测定免疫豚鼠球蛋白荧光抗体的染色效价，然后按染色效价1∶4的浓度用Kolmers盐水稀释备用。

步骤

1）涂片或切片固定，置于染色湿盒内。

2）吸取经适当稀释的免疫血清和补体等量混合液（此时免疫血清及补体又都稀释1倍）滴于切片上，37℃孵育30min。

3）PBS洗涤，每次5min×2次，吸干或吹干标本周围液体。

4）滴加经过适当稀释的抗补体荧光抗体，37℃孵育30min，水洗同步骤3）。

5）PBS 洗涤，每次 5min×2 次，吸干或吹干标本周围液体。

6）蒸馏水洗 1min，缓冲甘油封固。

对照染色

1）抗原对照。

2）抗血清对照：用正常兔血清代替免疫血清。

3）灭活补体对照：将补体经 56℃ 30min 处理后，按补体同样比例稀释，与免疫血清等量混合后，进行补体法染色。

本法的荧光抗体不受免疫血清的动物种属的限制，因而一种荧光抗体可作更广泛的应用，敏感性亦较间接法高，效价低的免疫血清亦可应用，节省免疫血清，尤其是对检查形态小的如立克氏体、病毒颗粒等或浓度较低的抗原物质时甚为理想。

（四）双重或多重免疫荧光标记染色

采用呈现不同颜色的荧光色素配伍，分别标记不同的抗体，再通过各自与同一切片上的相应抗原特异性结合而加以区别显示所建立起来的双重或多重免疫组化染色技术。

荧光素配伍：异硫氰酸荧光素（FITC）常与罗丹明（RB200）或异硫氰酸四甲基罗丹明（TRITC）配伍，前者呈黄绿色，后两者呈红色。

操作举例

垂体腺瘤——ACTH 与 GH 双重免疫荧光标记染色（间接法）

1）石蜡切片，厚 5μm，常规二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化，入 PBS(pH7.4,0.01mol/L)。

2）1%人血清白蛋白（HAS）孵育 10min，亦可用 10%正常羊血清代之，不洗。

3）抗 ACTH 血清（McAb）1∶200，湿盒 37℃孵育 30min。

4）0.05mol/L TBS（pH7.4，内含 1% TritonX-100，下同）清洗，10min×3 次。

5）羊抗鼠 IgG-TRITC 1∶100，湿盒，室温避光反应 1h。

6）0.05mol/L TBS（pH7.4）洗涤，10min×3 次（第一重 ACTH-TRITC 标记染色已完成）。

7）切片逐级乙醇脱水，二甲苯透明，空气干燥后，置于装有多聚甲醛粉末的密闭容器内，放在 80℃烤箱或温箱内以甲醛蒸气固定 2～4h，使第一重染色中二抗的抗原结合部位失活。

8）切片以 TBS 洗，5min×4 次。

9）1% HSA（或 10%正羊血清）孵育 30min，室温，湿盒，不洗。

10）抗 GH 血清（McAb）1∶400，湿盒 37℃孵育 30min。

11）0.05mol/L TBS（pH7.4）洗涤，10min×3 次。

12）羊抗鼠 IgG-FITC 1∶100，湿盒，室温避光反应 1h。

13）0.05mol/L TBS（pH7.4）洗涤，10min×3 次（第二重 GH-FITC 标记染色完成）。

14）缓冲甘油封片。

15）荧光显微镜下分别以 546nm 及 490nm 波长的激发光观察切片组织内 TRITC

及 FITC 所标示的 ACTH 及 GH 抗原（TRITC 阳性细胞呈红色，FITC 阳性细胞呈绿色）。

16）用彩色底片对切片同一部位用 546nm 及 490nm 波长激发光分别作两次曝光，即可在同一张照片上显示不同颜色标示的 ACTH 与 GH 两种抗原。

结果显示

荧光观察应在通风良好的暗室内进行。经荧光抗体染色的标本应在染色当天镜检，每次镜下观察时间以 1～2h 为宜，时间过长将使高压汞灯的发光亮度下降，荧光减弱，工作人员观察过久对眼睛也有不良影响。做油镜检查时，必须用无自发荧光的镜油。

荧光显微镜所观察到的图像，主要以两个指标判断结果，一个是形态学特征；另一个是荧光的亮度，在结果的判定中，必须将二者结合起来，综合判定。

观察标本的特异性荧光强度一般用“+”号表示。“−”为无或仅见极微弱荧光；“+”为荧光较弱但清楚可见；“++”为荧光明亮；“+++”为耀眼的强荧光。临床上根据特异性荧光强度达“++”以上判定为阳性，而对照光应呈“−”或“±”。根据呈“++”的血清最高稀释度判定特异性抗体效价。

五、免疫荧光染色影响因素

（一）pH

荧光素在溶剂中基本上处于离子化状态，因此，溶剂中的氢离子浓度对荧光强度的影响是极大的。每一种荧光素都有自己合适的 pH，它保持荧光素分子与溶剂之间的电离平衡。pH 的改变可以引起荧光素荧光光谱的改变，并可造成荧光强度的降低。

（二）温度

一般情况下，环境温度的升高对荧光染色有明显的影响。因为，温度升高可造成溶液黏滞性增加，溶剂和荧光素分子的动力增大，使荧光淬灭的可能性随之加大，这就使荧光素分子与其他分子之间的相互碰撞概率增加，因此，影响了荧光素的荧光强度。一般情况下，温度在 20℃时，荧光素即开始表现温度淬灭作用。随温度升高，荧光淬灭作用就越强，可至荧光完全淬灭。温度在 20℃以下，荧光素的荧光强度随温度的变化改变不明显，基本上保持恒量。因此，在适当的低温环境中进行荧光显微观察，可得到更好的效果。

（三）荧光素的浓度

在溶液浓度较稀时，荧光强度随荧光素浓度增加而增加。当荧光素浓度增加到一定程度时，荧光强度达到最大。再继续增加浓度，荧光素发生的光可能被邻近的分子吸收，使荧光强度下降。

（四）细胞固定剂

某些细胞固定剂如甲醛固定的细胞比不固定的细胞荧光强度减弱50%左右。虽然醇类固定剂也有轻微的淬灭荧光作用，但其影响较小。

（五）非特异性荧光染色

免疫荧光染色除特异性荧光之外，还出现一些与靶抗原-抗体反应无关的荧光，统称为非特异性荧光。非特异性荧光染色可由于某些抗原的自发荧光及交叉反应等多种因素产生。有些非特异性荧光染色可通过对照进行鉴别与排除，有些则要通过对抗原的纯化、抗体的提纯、提高荧光抗体结合物的比例等方面寻找原因逐项清除。

第五节 免疫金银法

免疫金银法（immunogold-sliver method，IGSM）或称免疫金银染色（immunogold-sliver staining，IGSS）是一种新的免疫组织化学技术，随着近年来的不断改进，已成为最为灵敏而又经济的方法之一。免疫金银法是在免疫金法的基础之上发展形成。

免疫金和免疫金银法都是利用胶体金作为标记物。胶体金系指金的水溶胶，溶胶是一种物质以大或小的微小粒子分散在另一种物质中所形成的体系，被分散的物质叫分散相，容纳分散相的物质叫分散介质。按分散相离子的大小可将分散体系分为三种，相分散体系（分散相粒子直径大于10nm）；胶体分散体系（分散相粒子直径为1～100nm）；低分子-离子分散体系（分散相粒子直径小于1nm）。胶体金属于胶体分散体系，是指金以微小的粒子分散在水中所形成的金溶胶。它能迅速而稳定地吸附蛋白质，对蛋白质的生物学活性则没有明显的影响。因此，用胶体金标记一抗、二抗或其他能特异性结合免疫球蛋白的分子（如葡萄球菌A蛋白）等作为探针，就能对组织或细胞内的抗原进行定性、定位，甚至定量研究。

由于胶体金有不同大小的颗粒，且胶体金的电子密度高，所以免疫胶体金技术特别适合于免疫电镜的单标记或多标记定位研究。由于胶体金本身呈淡至深红色，因此也适合进行光镜观察。如应用银加强的免疫金银法则更便于光镜观察。溶胶的颜色取决于分散相物质的颜色，对同一种物质的溶胶而言，粒子大小不同，颜色也不同。若粒子为20～40nm的金溶胶因主要吸收波长为530nm的绿光而呈深红色，60nm的金溶胶因主要吸收波长为600nm的橙黄色光而呈紫蓝色。在光镜水平应用的胶体金粒直径不能小于10nm，否则无可见的红色。

一、免疫金法

免疫金法是将用胶体金（直径>20nm）标记的间接抗体或A蛋白再与特异性抗体结合，在光镜下就可见红色的反应物出现，不需进行呈色反应。但该法要求金标抗体浓度高，因此，价格昂贵，既不经济同时也不够敏感。

二、免疫金银染色

免疫金银染色（IGSS）是在免疫金染色的基础上，在对苯二酚存在的情况下，通过含银离子的显影液中的还原反应，使在抗原抗体反应部位的金粒子周围形成很多沉淀层，光镜下就可看到阳性反应部位呈清晰的棕黑色，从而显示不易被光镜定位的金粒，显示出组织中抗原的部位。这种方法不仅提高灵敏度，同时金标记抗体可以稀释 10 倍以上后应用，此外还可避免使用具有致癌危险的有机色素。

（一）免疫金银染色法的优点

1）敏感性高。与其他的免疫组织化学技术相比，IGSS 法被认为是最敏感的方法，尤其适合于只含微量抗原的组织标本。

2）应用范围广。IGSS 法不仅可以在冰冻切片，细胞涂片以及培养细胞、石蜡切片上进行光镜观察，而且还能应用于树脂包埋的切片的电镜观察，并且能准确定位抗原。

3）定位准确。IGSS 法的银颗粒沉积在抗原-抗体反应部位，一般无扩散，定位较为准确。

4）方法简便、安全、成本低、经济、同时标本也可以长期保存。

5）用醋酸银代替硝酸银和乳酸银，不仅保持了原有方法的敏感性、特异性、低背景、对比度好的特点，而且整个显影过程可以在常光下进行，从而弥补了在暗室显色的不足。

（二）免疫金银染色法的缺点

非特异性背景染色影响了免疫金银染色法在常规免疫组织化学鉴别诊断上的应用。但若能较好地控制染色的各关键环节，如特异性抗体的纯度，特异性；切片的消化以及显影液的配制和显影时间的控制等，能较好地解决这一问题。

三、彩色免疫金银法

（一）基本原理

彩色免疫金银法（coloured IGSS，CIGSS）是在 IGSS 基础上发展起来的一种新方法。其基本原理与彩色显影相似。IGSS 染色方法在抗原位点处生成银颗粒，经铁氰化钾与溴化钾的作用即被氧化成溴化银，后者与彩色显影剂相接触立即被还原成金属银，而彩色显影剂本身则被氧化，其氧化产物使彩色成色剂由无色变成有色的染料并沉积在银颗粒的部位，金属银变成了银离子。由于染料只能通过彩色显影剂沉积在有银的部位，所以不与组织发生非特异性吸附。

（二）彩色免疫金银法优点

1）阳性结果比黑色更鲜明。

2）可以使弱信号得到放大。
3）消除 IGSS 背景染色。
4）信号/背景比值高。

（三）彩色显影背景过染的处理方法

彩色免疫金银法，在胶体金技术中是一个很大的突破，它的优点是结果鲜明，对比度好，但是在彩色显影过程中时间过长，背景可有一些着色，彩色显影的时间控制很重要。一旦过染可用以下方法处理。

1）将 100%乙醇滴到组织切片上 3～5s，立即冲掉，水洗，充分洗去乙醇，如果洗不彻底，易造成阳性结果褪色。
2）将 75%乙醇滴到切片上 1min，立即冲掉，褪色不能时间过长，过长后阳性结果全部褪掉。

（四）操作步骤

以彩色显影人肝组织内 HBsAg 的为例：

1）脱蜡至水。
2）0.1%胰蛋白酶 37℃ 10min。
3）Lugol 碘液 5min。
4）5%硫代硫酸钠 1min。
5）用 0.05mol/L pH7.4 TBS 振洗 5min×2 次。
6）1%卵白蛋白封闭 10min。
7）马抗 HBsAg 抗体 1∶1000 稀释，37℃ 1～2h 或 4℃过夜。
8）0.05mol/L pH7.4 TBS 振洗 5min×2 次。
9）1%卵白蛋白封闭 10min。
10）PAg 1∶40，37℃ 45min。
11）0.05mol/L pH7.4 TBS 振洗 5min×2 次。
12）双蒸水洗 5min×2 次。
13）物理显影。
14）自来水冲洗。
15）双蒸水洗 5min×2 次。
16）2%铁氰化钾和 1%溴化钾，1min。
17）双蒸水冲洗。
18）彩色显影（α-萘酚或菲尼酮）2min。
19）双蒸水冲洗。
20）2%铁氰化钾和 1%溴化钾，1min。
21）2%铁硫代酸钠和 1%亚硫酸钠，5min。
22）流水冲洗。
23）如需要可用苏木素或核红复染。

24）缓冲甘油封固，观察。

（刘秋燕）

参考文献

倪灿荣，马大烈，戴益民．2006．免疫组织化学实验技术及应用．北京：化学工业出版社．

倪灿荣，马大烈，朱明华．2007．免疫组化技术在病理诊断中应用的新进展．临床与实验病理学杂志，23（03）：346～349．

吴秉铨，刘彦仿．2009．免疫组织化学病理诊断．北京：北京科学技术出版社．

周小鸽．2004．免疫组化染色过程中存在的问题及对策．病理诊断学杂志，1（4）：211～213．

Chan JKC. 2000. Advances in immunohischemistry：Impact on surgical practice. Semin Diagn Pathol，17：170.

Coons AH，Creech HJ. 1950. Localization of an antigen in tissue cells II Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J Exp Med，91：1～13

Coons AH，Creech HJ，Jones RN. 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Pro Soc Exp Bio Med，47：200～202.

Shi Sr，Key ME，Kalra KL. 1991. Antigen retrieval in formalin fixed，paraffin embedded tissue：An enhancement method for immunohistochemical staining based on microvave oven heating of tissue section. J Histochem Cytochem，39：741.

Shi Sr，Tandon AK，Hau SS，et al. 1992. Immunohistochemical study of intermediate filament protein routinely processed xelloid embedded human temperal bone sections. Laryngoscope，102：734.

Sternbergen LA，Hardy PHJ，Cuculis JJ，et al. 1970. The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry，preparation of soluble antigen-antibody complex（Horse-radish peroxidase-antihorse complexes）and its use in the identification of spirochets. J Histochem Lytochem，18：315～333.

第二十八章　免疫细胞信号转导研究技术

第一节　信号转导的基本理论

一、G 蛋白及其偶联的效应酶

G 蛋白是细胞内一类重要的信号转导蛋白。哺乳动物体内许多激素、神经递质、神经冲动、光、药物等通过膜受体与 G 蛋白偶联，从而将信息传递至细胞内而发挥作用。这一高度特异性的传导能够调节多种信号转导通路的活性从而产生各式各样的生物学效应。

（一）G 蛋白的结构和种类

G 蛋白/GTP 结合蛋白能与 GTP 结合，水解 GTP 生成 GDP，即具有 GTP 酶（GTPase）活性，是位于细胞膜胞质面的外周蛋白，一般是指与 7 次跨膜受体偶联的三聚体 GTP 结合蛋白。组成 G 蛋白的 3 个亚基包括 α 亚基（45kDa）、β 亚基（35kDa）和 γ 亚基（70kDa），总分子质量为 100kDa 左右。β 亚基与 γ 亚基紧密结合形成单一的 βγ 亚基。α 亚基包含鸟苷酸结合区，并具有与 β 亚基结合的位点。G 蛋白整个结构通过 α 亚基的 N 端和 γ 亚基的 C 端这两个疏水性连接锚定在膜上。

G 蛋白有两种构象，一种为非活化型，是与 GDP 结合的 αβγ 三聚体；另一种为活化型，是 α 亚基与 GTP 结合，βγ 亚基脱落。不同种类的 G 蛋白由相应的基因编码。异源三聚体 G 蛋白有许多种，常见的有激动型 G 蛋白（stimulatory G protein，Gs）、抑制型 G 蛋白（inhibitory G protein，Gi）和磷脂酶 C 型 G 蛋白（PI-PLC G protein，Gp）。不同的 G 蛋白能特异地将受体和与之相应的效应酶偶联起来。目前主要依据 G 蛋白结构、氨基酸序列及进化的相似性与功能等分为 4 类，至少有 21 种、5 种和 8 种不同的 α、β 和 γ 亚基。

（二）G 蛋白的功能和信号转导机制

G 蛋白偶联系统由 3 部分组成：表面受体、G 蛋白和效应物（如腺苷酸环化酶和磷脂酶 C），这 3 种复合物都结合在膜上（图 28-1）。G 蛋白偶联受体是已知的 3 类涉及跨膜信号转导的膜受体之一。目前已有 2000 多种 G 蛋白偶联受体得到确认，构成了人类最大的蛋白质超家族。G 蛋白偶联受体为 7 次跨膜蛋白（图 28-2），受体胞外结构域识别胞外信号分子并与之结合，胞内结构域与 G 蛋白偶联。通过与 G 蛋白偶联，激活细胞内的效应酶，在细胞内产生第二信使，从而将胞外信号跨膜传递到胞内。

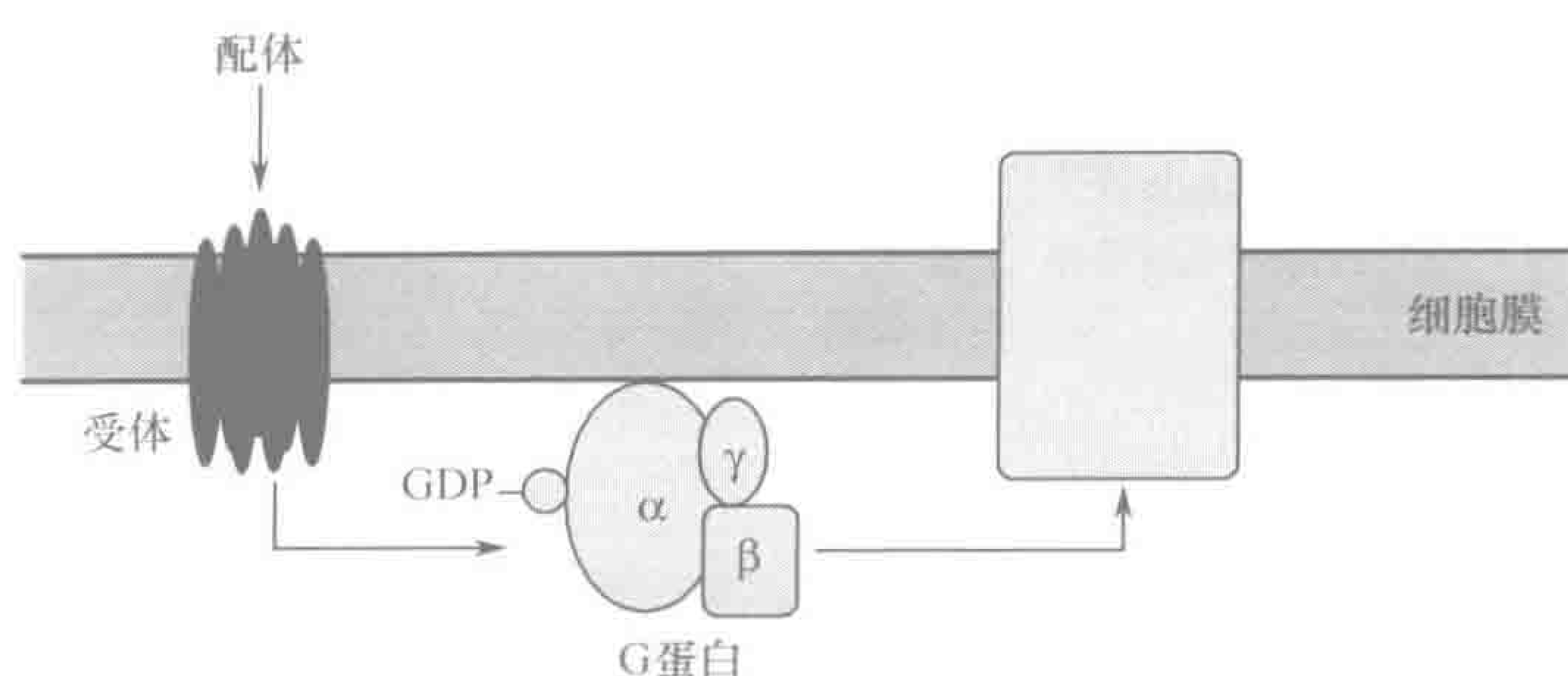


图 28-1　G 蛋白偶联信号转导系统的组成

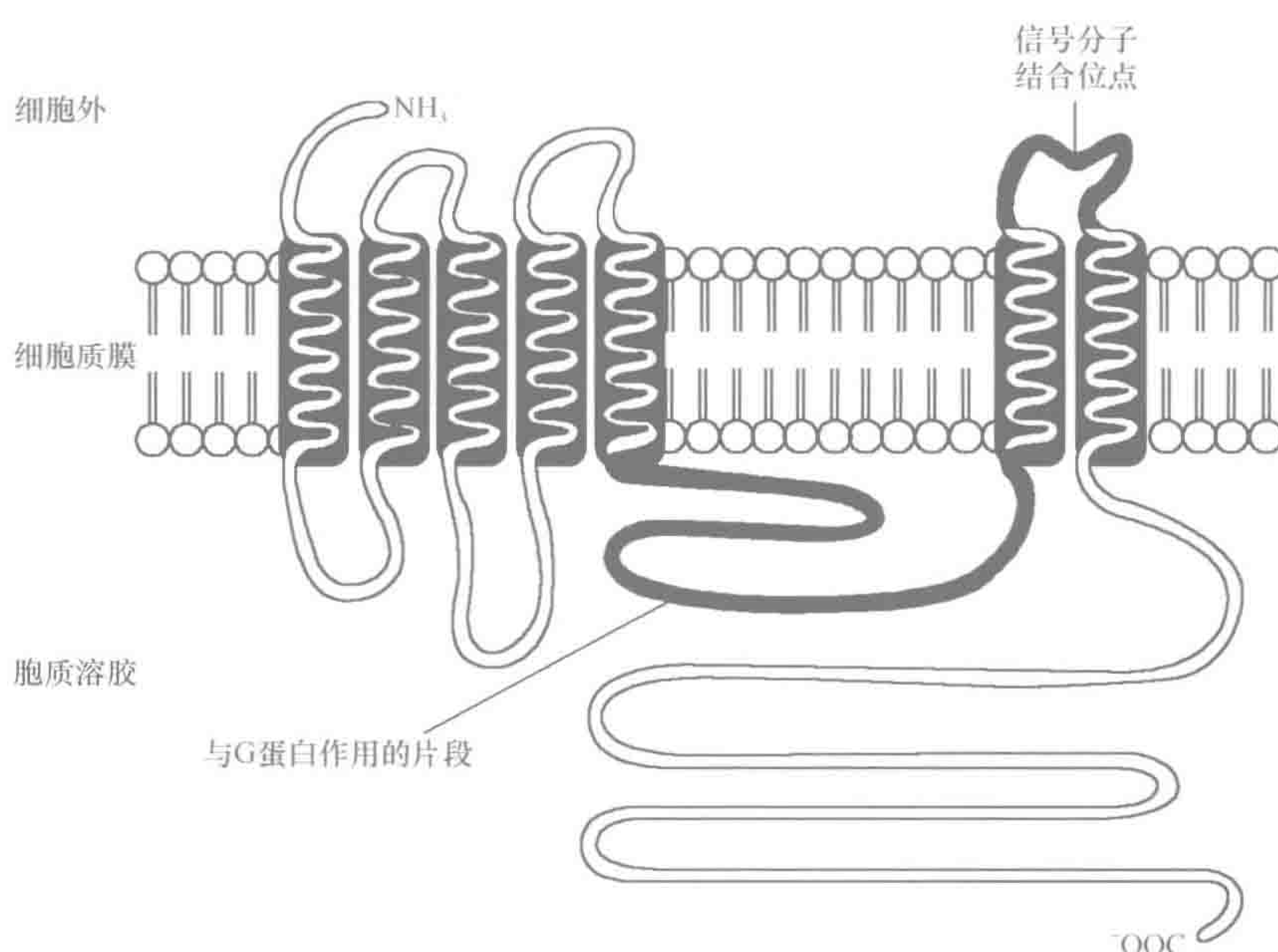


图 28-2　G 蛋白偶联受体为 7 次跨膜蛋白

G 蛋白的 α 亚基既可与 GTP 结合，又可与 GDP 结合，这一特性使 G 蛋白在信号转导过程中发挥着分子开关的作用（图 28-3）：①当外部没有刺激信号时，α 亚基与 GDP 结合时处于关闭状态；②当外部有信号时，α 亚基与 GTP 结合时被激活，与 βγ 亚基分开，即处于开启状态，随后作用于效应物，产生细胞内信号，从而引起细胞的各种反应；③α 亚基具有 GTP 酶活性，能催化所结合的 GTP 水解，α 亚基-GDP 复合物重新结合 βγ 亚基，使 G 蛋白失活，处于关闭状态。信号的传递即通过以上 3 个过程依次循环来完成。G 蛋白的 α 亚基 GTP 酶活性的强弱就决定了活化态 G 蛋白有效期的长短，从而进一步使 G 蛋白在信号转导过程中起到分子开关的作用。

在信号转导过程中，G 蛋白主要起到以下作用：①信号放大作用：通常一个细胞外信号可以激活许多 G 蛋白，可向细胞内传递更多的信号，从而起到级联放大的作用；另外，细胞外信号与受体结合的时间比较短，不能产生足够的放大作用，但是 G 蛋白结合 GTP 而被激活的时间较长（10～15s），所以虽然外界信号已经不存在，但是 G 蛋

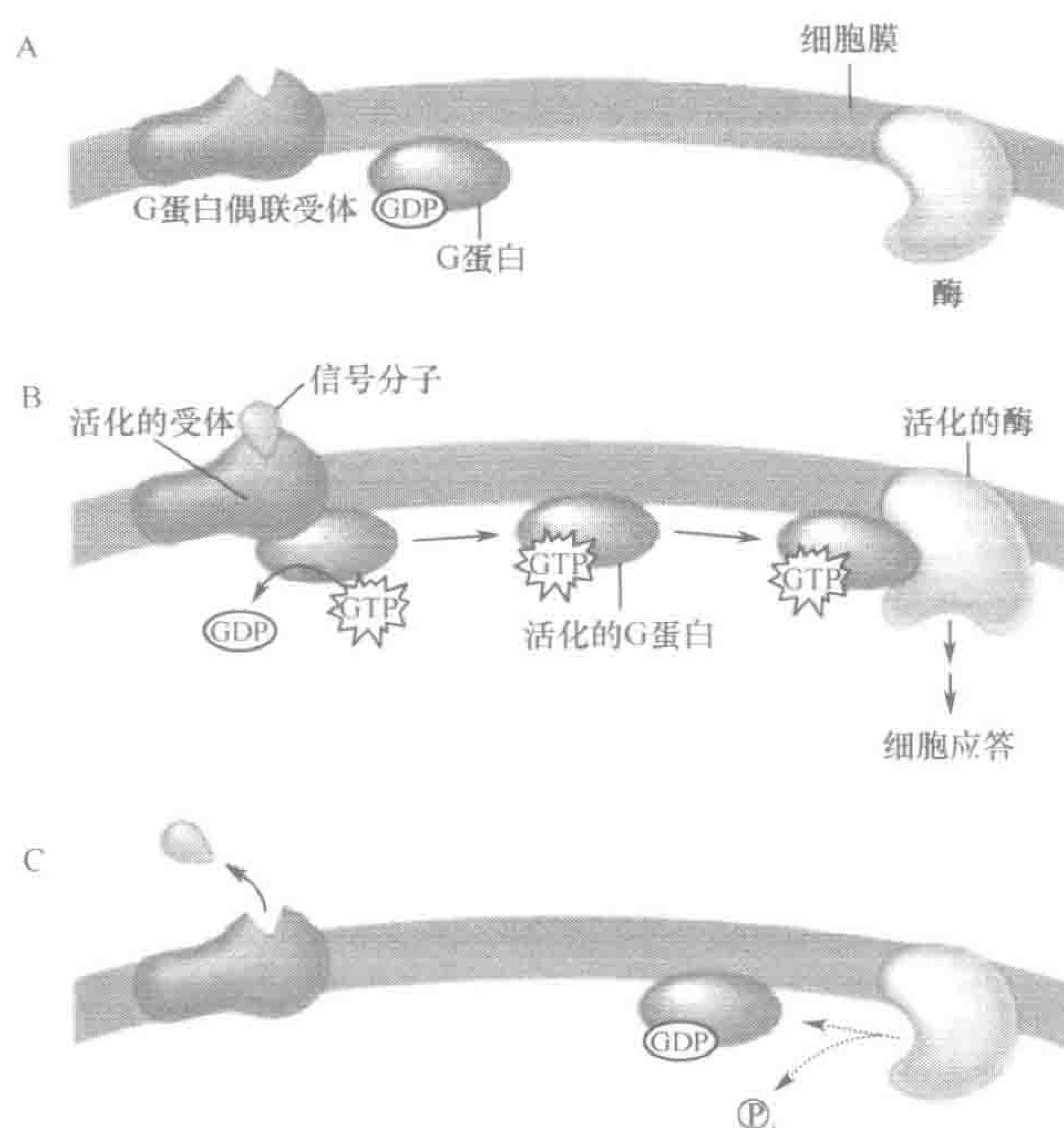


图 28-3　G 蛋白分子开关

A. 失活状态下的 G 蛋白系统；B. 活化状态下的 G 蛋白系统；C. 回到失活状态

白仍能活化相应的酶系统，不断传递信号；②分子开关作用：正常的生理条件下，G 蛋白与 GDP、GTP 结合状态的可逆变化使一些信号转导精确而适度、不是持续的而是对细胞外信号的瞬间的反应，一旦破坏了这种正常的正、负反馈机制，细胞就会发生病变。虽然 G 蛋白在信号转导过程中具有信号放大的作用，但是这种放大作用不能无限地放大，必须受到适度的控制，这就体现了 G 蛋白的分子开关作用。

（三）G 蛋白的主要效应物

由 G 蛋白偶联受体所介导的效应物主要包括：腺苷酸环化酶（adenylyl cyclase，AC）系统和磷脂酶 C（PLC）系统。

1. 腺苷酸环化酶

腺苷酸环化酶系统是发现最早、研究最多的由 G 蛋白调节的系统之一。在腺苷酸环化酶信号转导途径中存在着两种作用相反的 G 蛋白：Gs 与 Gi。它们通过增加或抑制腺苷酸环化酶的酶活性来调节细胞内 cAMP 浓度，进而影响细胞的功能（图 28-4）。

Gs 调节模型

当细胞没有受到配体（信号分子）刺激时，Gs 处于非活化态，α 亚基与 GDP 结合，此时腺苷酸环化酶没有活性；当 β 肾上腺素受体、胰高血糖素受体等激动型受体被激活后，激动型受体构象改变，暴露出与 Gs 结合的位点，使激素-受体复合物与 Gs 结合，Gs 的 α 亚基构象改变，从而排斥 GDP，结合 GTP 而活化，使三聚体 Gs 蛋白解离出 α 亚基和 βγ 亚基复合物，并暴露出 α 亚基与腺苷酸环化酶的结合位点；结合 GTP 的

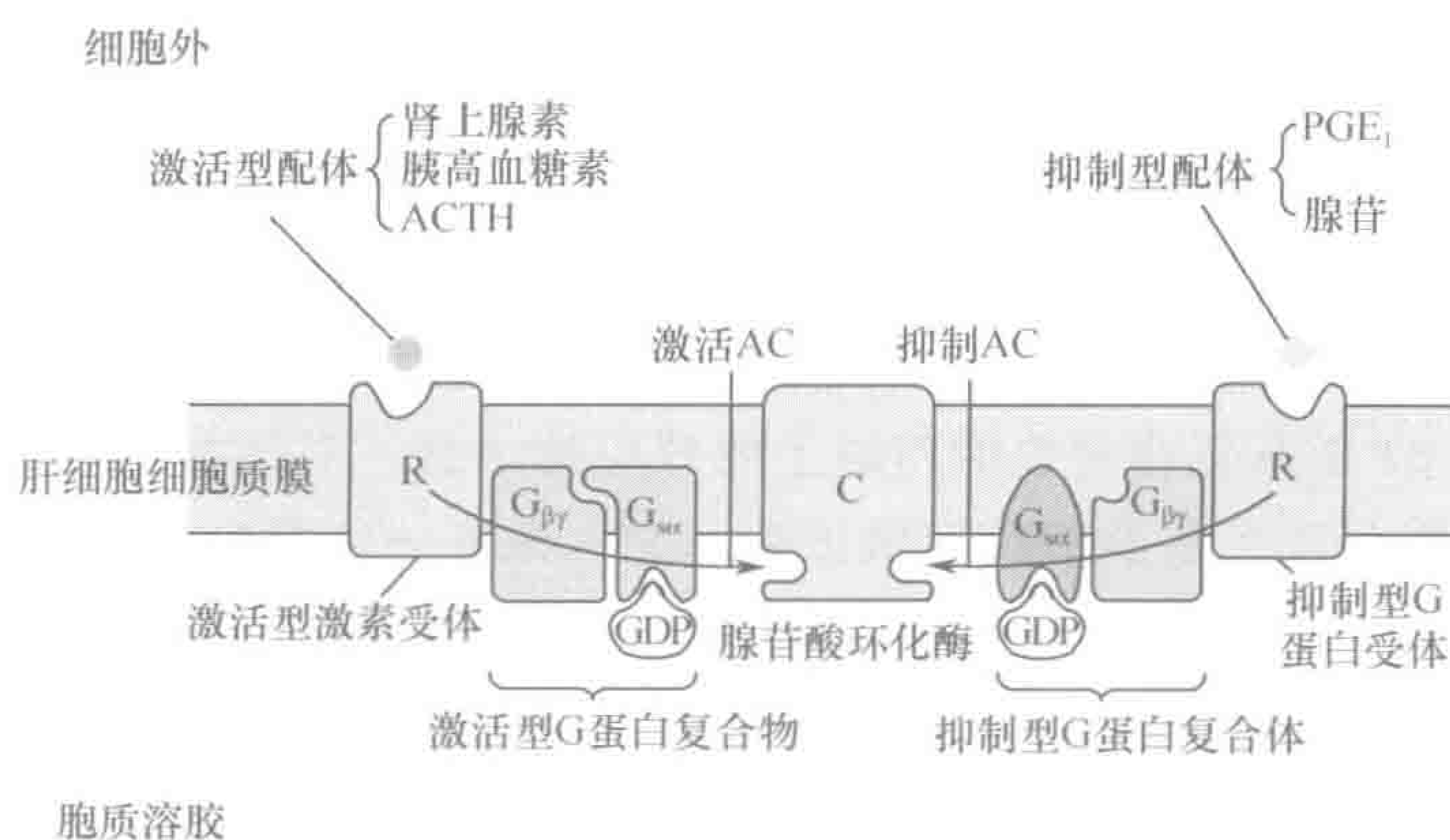


图 28-4　Gs 和 Gi 调节模型

α 亚基与腺苷酸环化酶结合，使之活化，将 ATP 转化为 cAMP（图 28-5），并进一步激活 cAMP 依赖的蛋白激酶 A（protein kinase A，PKA）的活性。PKA 由两个催化亚基和两个调节亚基组成（图 28-6），每个调节亚基上有 2 个 cAMP 结合部位。调节亚基与催化亚基相结合时，PKA 呈无活性状态。当 4 分子 cAMP 与 2 个调节亚基结合后，调节亚基脱落，游离的催化亚基具有蛋白激酶活性，能够催化细胞内某些蛋白的丝氨酸或

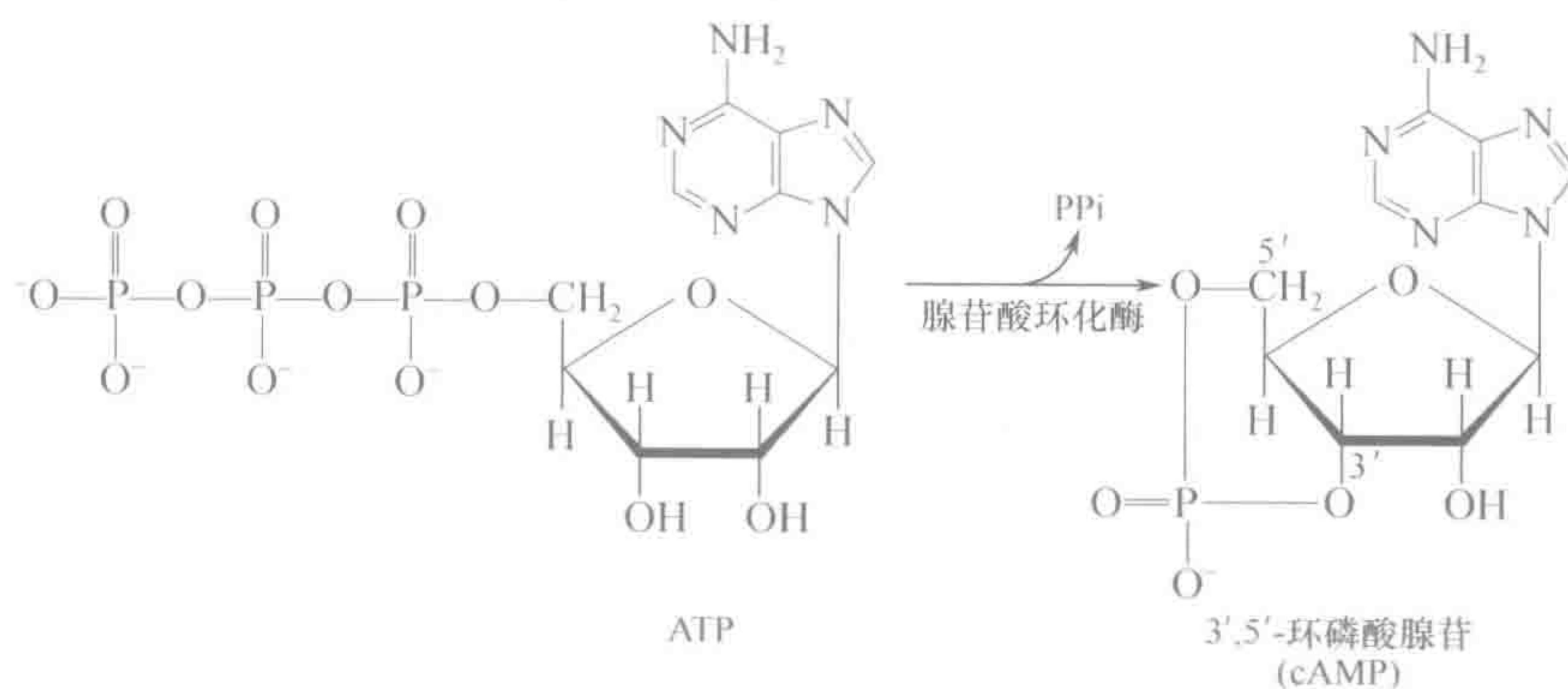


图 28-5　cAMP 的生成

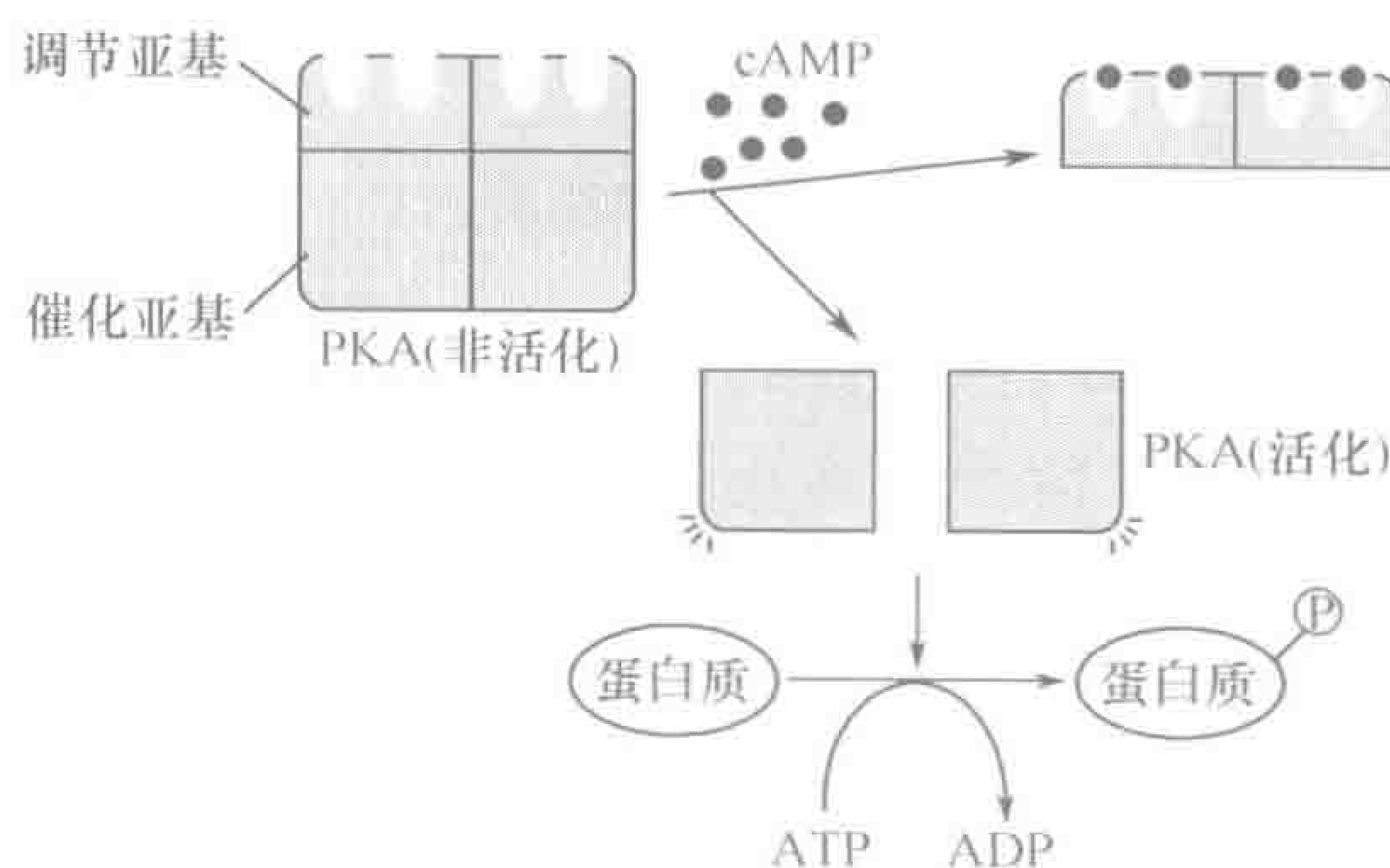


图 28-6　PKA 的激活

苏氨酸残基发生磷酸化，从而改变这些蛋白的活性，进一步影响到相关基因的表达。随着 GTP 的水解，α 亚基恢复到原来的构象并与腺苷酸环化酶解离，终止腺苷酸环化酶的活化作用。α 亚基与 βγ 亚基重新结合，使细胞回复到静止状态。活化的 βγ 亚基复合物也可直接激活胞内靶分子，具有传递信号的功能，如心肌细胞中 G 蛋白偶联受体在结合乙酰胆碱刺激下，活化的 βγ 亚基复合物能开启质膜上的 K^+ 通道，改变心肌细胞的膜电位。此外 βγ 亚基复合物也能与膜上的效应酶结合，对结合 GTP 的 α 亚基起协同或拮抗作用。该信号途径涉及的反应链可表示为：激素→G 蛋白偶联受体→G 蛋白→腺苷酸环化酶→cAMP→依赖 cAMP 的蛋白激酶 A→基因调控蛋白→基因转录。

Gi 调节模型

激素配体与 α2 肾上腺素能受体、M2 胆碱能受体及血管紧张素Ⅱ受体等抑制型激素受体结合后，抑制型激素受体构象改变，使三聚体 Gi 蛋白活化，Gi 可通过两个途径抑制腺苷酸环化酶系统的作用：①通过 α 亚基与腺苷酸环化酶结合，直接抑制酶的活性；②通过 βγ 亚基复合物与游离 Gs 的 α 亚基结合，阻断 Gs 的 α 亚基对腺苷酸环化酶的活化（图 28-4）。

2. 磷脂酶 C

磷脂酶 C-β（PLC-β）是 G 蛋白的直接效应物。胞外信号分子与细胞表面 G 蛋白偶联型受体结合，激活质膜上的 PLC-β，使质膜上 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇（PIP2）水解成 1,4,5-三磷酸肌醇（IP3）和二酰甘油（DAG）两个第二信使，胞外信号转换为胞内信号（图 28-7）。

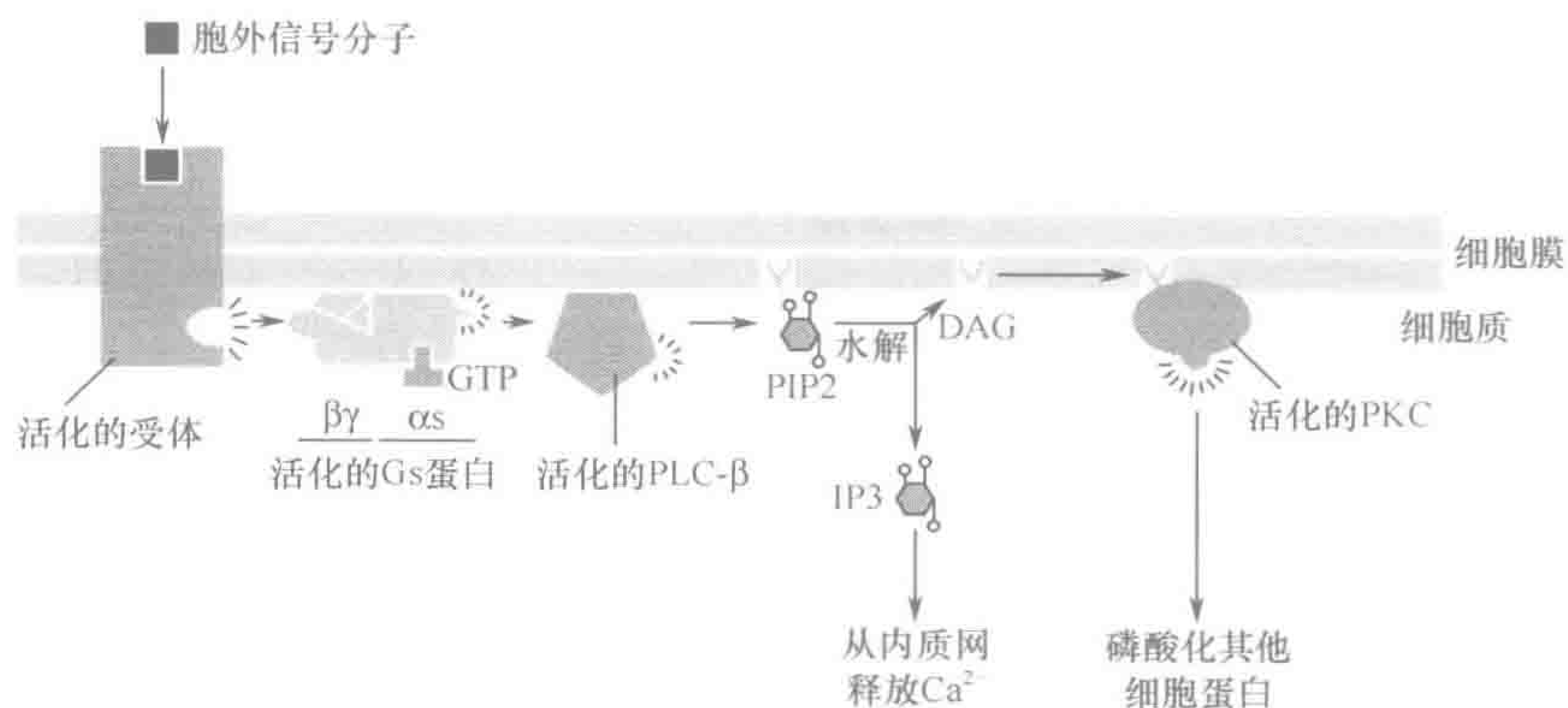


图 28-7　磷脂酰肌醇途径

IP3 与内质网上的 IP3 配体门钙通道结合，开启钙通道，使胞内 Ca^{2+} 浓度升高。激活各类依赖钙离子的蛋白。IP3 信号的终止是通过去磷酸化形成 IP2，或被磷酸化形成 IP4。Ca^{2+} 由质膜上的 Ca^{2+} 泵和 Na^+-Ca^{2+} 交换器抽出细胞，或由内质网膜上的钙泵抽进内质网。

DAG 结合于质膜上，可活化与质膜结合的蛋白激酶 C（protein kinase C，PKC）。PKC 以非活性形式分布于细胞溶质中，当细胞接受刺激，产生 IP3，使 Ca^{2+} 浓度升高，PKC 便转位到质膜内表面，被 DAG 活化（图 28-8），PKC 可以使蛋白质的丝氨酸/苏

氨酸残基磷酸化使不同的细胞产生细胞分泌、肌肉收缩、细胞增殖和分化等不同的反应。DAG 的作用可用佛波酯（phorbol ester，PMA）模拟。DAG 通过两种途径终止其信使作用：一是被 DAG-激酶磷酸化成为磷脂酸，进入磷脂酰肌醇循环；二是被 DAG 酯酶水解成单酯酰甘油。由于 DAG 代谢周期很短，不可能长期维持 PKC 活性，而细胞增殖或分化行为的变化又要求 PKC 长期活性所产生的效应；现发现另一种 DAG 生成途径，即由磷脂酶催化质膜上的磷脂酰胆碱断裂产生的 DAG，用来维持 PKC 的长期效应。

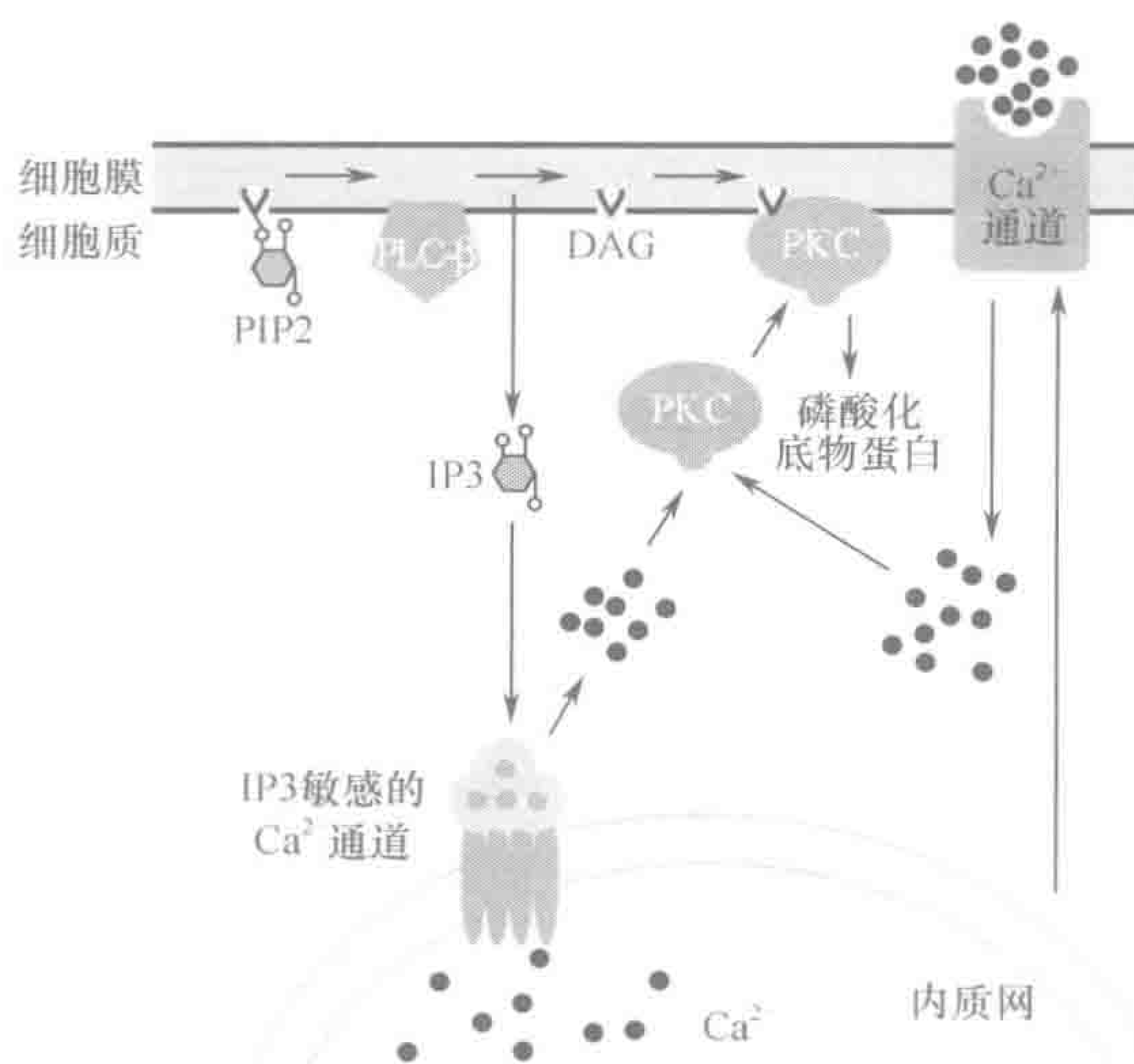


图 28-8　IP3 和 DAG 的作用

二、蛋白激酶 C

蛋白激酶 C（PKC）是一类使底物蛋白分子内丝氨酸/苏氨酸残基发生磷酸化的蛋白激酶家族。作为细胞信号转导通路中的重要组成成员，PKC 参与了受体的去敏感化、细胞生长及转录的调节、免疫反应、脑发育、突触可塑性、学习和记忆等多种生理过程，以及癫痫、缺血/低氧和神经元凋亡坏死等病理生理过程。

（一）PKC 家族成员及其结构

迄今为止，哺乳动物细胞内的 PKC 家族被认为是由 9 个基因编码的 10 个亚型（或同工酶）组成。根据各亚型的结构及所需激活物的不同，将 PKC 分为 3 组：①经典型 PKC（classical or conventional PKC，cPKC）包括 α、βⅠ、βⅡ和 γ 4 种亚型，该组 PKC 具有典型结构，可被 DAG、Ca^{2+} 和磷脂酰丝氨酸（PS）或 PMA 等激活；②新奇型 PKC（novel PKC，nPKC），该组包括 δ、ε、η 和 θ 4 种亚型，其激活只需要 DAG 或 PMA；③非经典型 PKC（atypical PKC，aPKC）包括 ι/λ 和 ζ 两种，目前其确切的激活机制尚不清楚，只知道这两种亚型的激活不依赖于 Ca^{2+} 或 DAG，但依赖于 PS 并可被磷酸肌醇 3-激酶（PI3-K）激活。此外，人们还发现了 PKCμ 和 PKCν 的存在，现在已分别被命名为 PKD1 和 PKD3。PKD 可被 DAG 或 PMA 激活，在细胞信号转导中被认为是 nPKC 的下游作用底物。

所有的 PKC 同工酶都含有 1 个调节结构域和 1 个催化结构域。每个域包含 4 个保守区（C1～C4）和 5 个可变区（V1～V5），C1 和 C2 在调节结构域，C3 和 C4 在催化结构域。cPKC 和 nPKC 的 C1 区含 2 个富半胱氨酸的锌指，即 C1a 和 C1b，C1b 参与 DAG 和佛波酯的结合；aPKC 的 C1 区只有 1 个锌指结构，功能尚不清楚。cPKC、nPKC 和 aPKC 的 C1 区附近有一个抑制结构，与催化域相互作用，使酶失活。在 cPKC 的激活中，Ca^{2+} 与 C2 区结合，PS 与 C2 区结合，酶构象改变；DAG 结合到 C1 区后，抑制结构与催化域的亲和力下降，PKC 转为活性。非 Ca^{2+} 依赖的 nPKC 和 aPKC 中是否存在该激活机制尚不清楚。

（二）PKC 的激活过程

关于 PKC 的完全磷酸化或以“成熟”形式转位到细胞膜的研究报道是 PKC 领域的里程碑性成果，即 PMA 处理细胞可使 PKC 发生膜转位（图 28-9）。

图 28-9　cPKC 的激活过程

受体控制的信号通路形成胞内信使物质钙离子和 DAG，同 PMA 一样激活 PKC。为启动蛋白激酶 C 活化，需要蛋白激酶 PDK-1 介导的磷酸化反应，PKC 的受体——RACK 蛋白也参与。PKC 的底物是 MARCK 蛋白和其他细胞骨架相关蛋白、Raf-1 激酶和维生素 D_3 受体（图 28-10）。

对于 cPKC 和 nPKC 来讲，细胞内大量的同工酶以成熟形式存在，并主要分布在胞质内。大量的同工酶弥散地分布在细胞质内，偶尔与细胞膜碰撞，但又迅速离开，因为它们与细胞膜之间无明显的相互作用。当信号使细胞内 Ca^{2+} 和 DAG 水平升高时，cPKC将发生如下变化：Ca^{2+} 与胞质内 cPKC 的 C2 结构域结合，并迅速地引起 cPKC 与细胞膜的碰撞，然后 C2 结构域与细胞膜接合，并将 cPKC 拴在细胞膜上。这是一种低亲和性的相互作用，其能量不能激活 cPKC。cPKC 需要在细胞膜上做进一步的平面扩散运动，来寻找嵌合在细胞膜内的配体——DAG。DAG 与 C1 结构域的结合可引起 cPKC与细胞膜间高亲和性相互作用，相互作用的能量可使 cPKC 的底物结合部位释放假底物。在这种“open”构象下，成熟的 PKC 可与作用底物结合、发生磷酸化反应，从而完成细胞信号向下游的转导过程（图 28-9）。

nPKC 没有 Ca^{2+} 敏感的 C2 结构域，因而不能被事先靶向到细胞膜上。因此它们的膜转位幅度要比 cPKC 至少低一个数量级，并大大地降低了与膜内配体（DAG）相遇

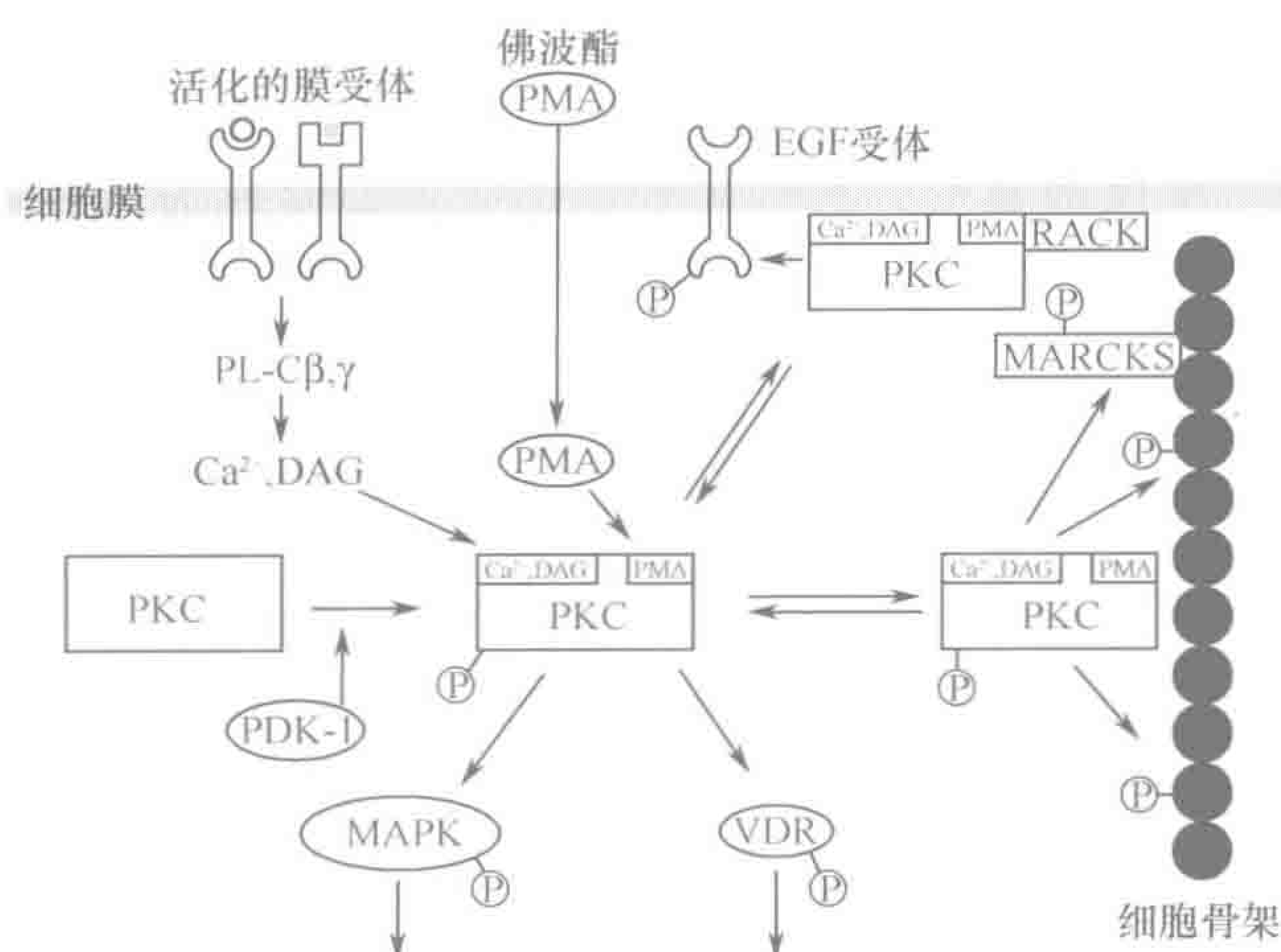


图 28-10　蛋白激酶 C 的功能和调节

的可能性。

尽管 aPKC 对 DAG 和 Ca^{2+} 均不发生反应，但 aPKC 亚型的激活还是需要 PDK-1 的磷酸化修饰。与 cPKC 和 nPKC 不同，PI3-K 可使 aPKC 激活环的磷酸化水平中度升高。这类同工酶的假底物同样需要变构调节，但其调节机制还不像 cPKC 和 nPKC 那样清楚。

（三）PKC 与信号转导途径

PKC 被上游信号激活后，可逆地激活特定的下游蛋白，参与信号转导途径。例如，生长因子与其细胞表面相关受体结合后产生信号，蛋白质的激活放大这些信号；PKC 一旦被激活，信号即通过不同的转导途径传递到细胞核，如丝裂原激活蛋白激酶（MAPK）级联被激活。细胞增殖、分化和死亡是 MAPK 成员作用的结果：Rab1 能被 Ras 激活，有时与 PKC 交叉反应；激活的细胞外信号调节激酶随之激活转录因子 myc、myb、los 和 jun，使编码细胞增殖、侵袭等代谢所需的酶的基因表达增强；JNK 途径通常促使细胞死亡，有时也通过 PKC 同工酶刺激该途径。另一个 PKC 激活的基因是鸟氨酸脱羧酶，该酶是精胺、亚精胺和腐胺生物合成的限速酶，这些多胺出现在细胞转化过程、肿瘤细胞 G_1 到 S 期的加速期和细胞外基质（ECM）降解过程，表明 PKC 参与肿瘤的发生和发展。

三、钙信号

Ca^{2+} 是细胞内的一种重要的信号分子。在细胞受到激素或电刺激后，胞质内的 Ca^{2+} 浓度会升高，这可以引起细胞内的其他反应。这种 Ca^{2+} 浓度的增加受到时间和空间的限制，因此形成了多样化的不同模式的 Ca^{2+} 信号。Ca^{2+} 能够影响机体的许多重要过程，包括肌肉收缩、视觉形成、细胞增殖、分泌、细胞活动性和细胞骨架的形成、基因表达、中间代谢反应等。以 Ca^{2+} 浓度在空间和时间上变化形式存在的 Ca^{2+} 信号在多种信号传递途径中作为组成部分参与细胞内的信号传递过程。

(一) 胞内 Ca^{2+} 浓度升高的途径

升高细胞内 Ca^{2+} 浓度的途径主要有 3 种：①G 蛋白介导的信号传递途径；②受体酪氨酸激酶参与的信号传递途径；③通过电压门控或配基门控 Ca^{2+} 通道的 Ca^{2+} 的内流。

分布于细胞膜上能够介导细胞内 Ca^{2+} 浓度增加的受体主要有几类：①由磷脂酶 C-β 介导的受体，如 α1 肾上腺素受体、胰高血糖素受体、5-羟色胺受体、血管加压素受体、催产素受体等。②由磷脂酶 C-γ 介导的受体，如表皮生长因子受体、血小板衍生生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体、T 细胞受体等。③直接作用的受体，如烟碱型乙酰胆碱受体、谷氨酸受体等。

(二) Ca^{2+} 作为信号分子的功能基础

机体瞬时发生的编码 Ca^{2+} 信号信息主要由细胞内各种的 Ca^{2+} 结合蛋白来进行破译，将信号转化为多种多样的生物化学变化。Ca^{2+} 执行调节功能主要有以下两种机制。

1. 直接激活蛋白质

许多蛋白质都包含一个或多个特异性 Ca^{2+} 结合位点，其活性也直接依赖于与 Ca^{2+} 的结合。这样，细胞内外的 Ca^{2+} 浓度可直接调控这些蛋白质的活性和功能（表 28-1）。有许多酶的活性中心也都含有特异性 Ca^{2+} 结合位点，与 Ca^{2+} 的结合对于酶的催化活性是必不可少的。

表 28-1　各种 Ca^{2+} 结合蛋白及其功能

蛋白质	功能	蛋白质	功能
肌钙蛋白 C	肌肉收缩调节分子	Ca^{2+} 激活 K^+ 通道	超极化效应物
钙调蛋白结合蛋白	肌肉收缩调节分子	$InsP_3$ 受体	细胞内 Ca^{2+} 释放
α 辅肌动蛋白	将肌动蛋白捆绑成束	Na^+/Ca^{2+} 转运蛋白	经由细胞膜交换 Na^+ 和 Ca^{2+}
绒毛蛋白	将肌动蛋白丝组织起来	Ca^{2+} ATP 酶	运输 Ca^{2+} 通过细胞膜
钙调素	蛋白激酶和其他酶的调节分子	恢复蛋白	调节鸟苷酸环化酶
钙神经素 B	蛋白磷酸酶	钙网蛋白	Ca^{2+} 储库
钙蛋白酶	蛋白酶	钙结合蛋白	Ca^{2+} 储库
磷脂酶 A2	释放花生四烯酸	集钙蛋白	Ca^{2+} 储库
蛋白激酶 C	普遍存在的蛋白激酶		

2. 与 Ca^{2+} 受体结合

通过 Ca^{2+} 信号传递的另外一个重要机制是 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 结合蛋白的结合，Ca^{2+} 结合蛋白也被称为 Ca^{2+} 受体，行使调节蛋白的功能，能将 Ca^{2+} 信号与其他信号蛋白偶联起来。Ca^{2+} 受体是一种 Ca^{2+} 传感器，在 Ca^{2+} 浓度发生改变时能够激活靶蛋白。Ca^{2+} 浓度升高到超过静息期 Ca^{2+} 浓度（大约 10^{-7} mol/L）可导致 Ca^{2+} 与受体上的 Ca^{2+} 结合位点的特异结合，同时，Ca^{2+} 受体会发生构象改变以便对其与下游靶蛋白的相互作用进行调节。

现在已知有多种 Ca^{2+} 受体需要 Ca^{2+} 浓度的升高来激活靶蛋白。也有一些 Ca^{2+} 受体，

其已激活的功能受到高浓度 Ca^{2+} 的抑制，因此，它们只在 Ca^{2+} 浓度较低时才具有活性。

钙调素

分布最广泛的 Ca^{2+} 受体是钙调素。钙调素是一种由大约 150 个氨基酸组成的小分子蛋白质。其特征性的 4 个螺旋-环-螺旋结构，即 EF-hand 结构，可以与 4 个 Ca^{2+} 相结合［kd（平衡解离常数）$=5\times10^{-7}\sim5\times10^{-6}$ mol/L］。与 Ca^{2+} 的结合可以诱导钙调素的构象发生明显改变，导致疏水性残基的暴露。推测 Ca^{2+}/钙调素与靶蛋白的相互作用就是在新暴露出来的疏水性残基介导下完成的。

钙调素调节靶蛋白活性的机制有很多种，可以分为几大类，主要包括：①不论有无 Ca^{2+} 的存在，钙调素都能与靶蛋白发生不可逆结合。磷酸化酶激酶就是一例，钙调素作为一个与其紧密结合的亚基被包含其中，在有 Ca^{2+} 存在时被激活。②在低 Ca^{2+} 浓度时，钙调素与靶蛋白形成一个没有活性、低亲和力的复合物；而在高 Ca^{2+} 浓度时，转变为有活性的复合物，如蛋白磷酸酶钙神经素（calcineurin）。③Ca^{2+}/钙调素激活靶蛋白，如 Ca^{2+}/钙调素依赖型蛋白激酶（图 28-11）。④Ca^{2+}/钙调素抑制靶蛋白活性，如 G 蛋白偶联受体激酶家族的成员和 $InsP_3$ 受体亚型。

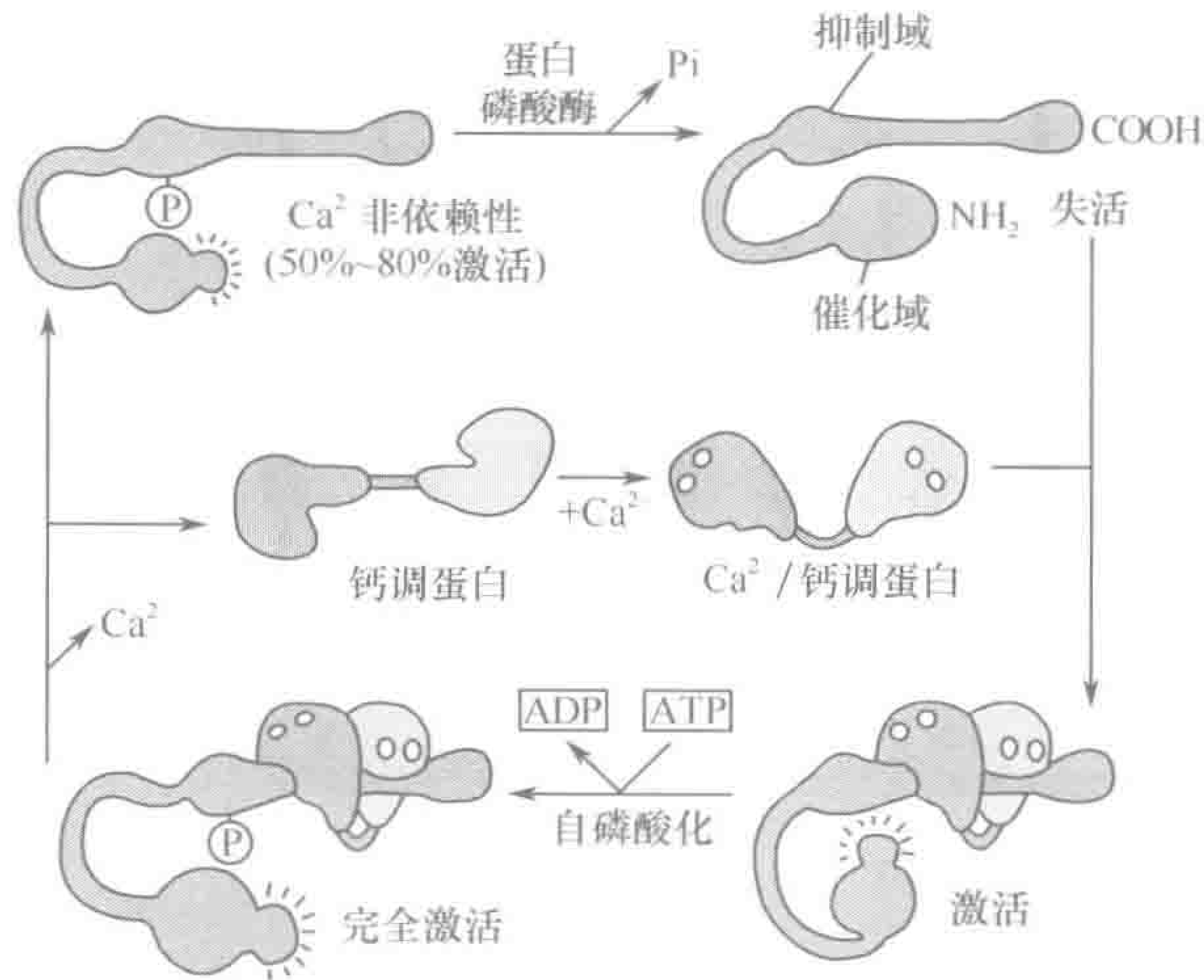


图 28-11　CaMKⅡ的激活

从靶蛋白以及它们与 Ca^{2+}/钙调素形成的复合物的结构来看，靶蛋白激活的机理主要有两种。其中一种是 Ca^{2+}/钙调素与底物的结合导致靶蛋白活性位点的自身抑制元件被移位，从而解除了自身抑制；另一种机理是对靶蛋白的活性位点进行重新塑造。

其他 Ca^{2+} 受体

细胞内还含有其他多种 Ca^{2+} 受体，其中一些与钙调素比较接近，存在于特定组织中并执行一些特定的功能。存在于肌肉中的肌钙蛋白 C（troponin C）是肌肉收缩装置的一个组成部分，在结构上非常接近钙调素，含有 4 个 EF-hand 结构，其中只有 2 个能与 Ca^{2+} 结合。Ca^{2+} 与肌钙蛋白结合可以诱导肌钙蛋白复合物构象发生改变，导致肌肉的收缩。

另外一种调节性 Ca^{2+} 受体是恢复蛋白（recoverin），它含有 4 个 EF-hand 结构和 2 个 Ca^{2+} 结合位点，以游离和膜结合两种形式存在并受到 Ca^{2+} 的调节。Ca^{2+} 与恢复蛋白结合使恢复蛋白从视杆细胞的胞质转位至胞膜上并抑制视紫质激酶的活性，在视觉过程的信号转导级联中发挥着重要的调控功能。

四、受体酪氨酸激酶及其信号转导

受体酪氨酸激酶（receptor protein tyrosine kinase，RTK）是一类自身含有酪氨酸激酶活性的受体，在脊椎动物中已发现 50 余种，主要为细胞因子和生长因子受体（图 28-12）。配体与 RTK 的结合是生物体内信息传递的基本机制之一。受体酪氨酸激酶的信号转导过程一般为：配体与受体结合→受体二聚化或寡聚化→跨膜区构象改变→受体发生自身磷酸化→RTK 被激活→通过蛋白激酶的磷酸化和（或）蛋白质-蛋白质相互作用，进一步传递信号并产生生物学效应，如细胞增殖、分化等。

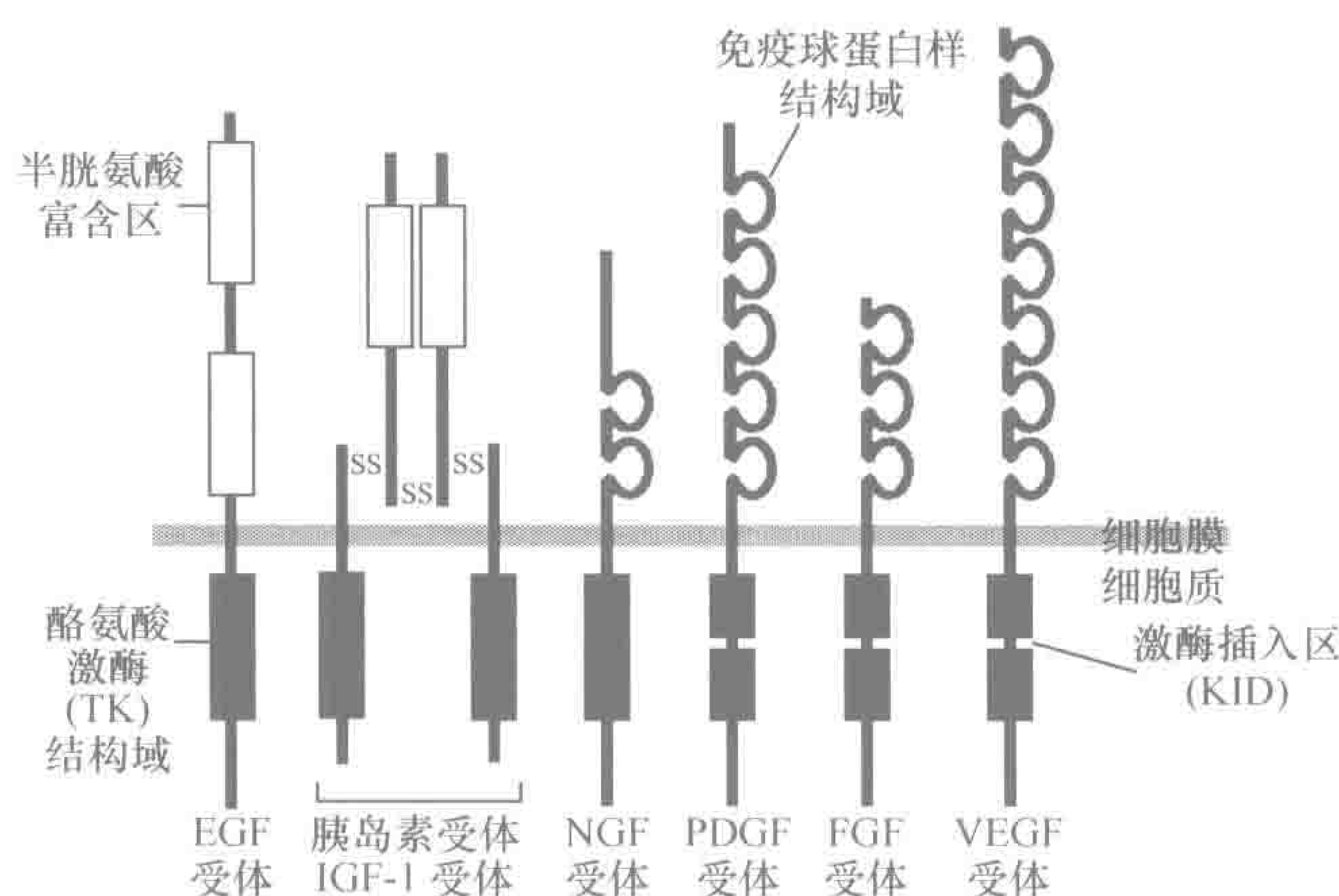


图 28-12　各种受体酪氨酸激酶的结构

（一）受体酪氨酸激酶的结构

RTK 在结构上均为单次跨膜蛋白，由 3 个部分组成：含有配体结合位点的胞外结构域、单次跨膜的疏水 α 螺旋区和含有酪氨酸蛋白激酶（TK）活性的细胞内结构域（图 28-12）。其细胞内侧还有调节序列，包括进行自身磷酸化及被其他蛋白激酶、蛋白磷酸酶磷酸化和去磷酸化的位点。胞外区是结合配体结构域，配体是可溶性或膜结合的多肽或蛋白类激素，包括胰岛素和多种细胞因子、生长因子。胞内段是酪氨酸蛋白激酶的催化部位。胞内 TK 区分为两种：一种 TK 区是连续的，如 EGF 受体；另一种 TK 区内存在一段亲水的氨基酸序列插入，如 PDGF 受体，这段插入序列成为激酶插入区（kinase insert domain，KID）。

配体（如 EGF）与受体的胞外结构域结合，受体就发生构象变化，导致受体二聚化（dimerization）形成同源或异源二聚体，在二聚体内彼此相互磷酸化胞内段酪氨酸残基，激活受体本身的酪氨酸蛋白激酶活性。磷酸化的受体肽链成为细胞内一些信号蛋白（效应蛋白）的结合位点。

（二）效应蛋白

效应蛋白根据功能不同分为以下几类（图 28-13）。

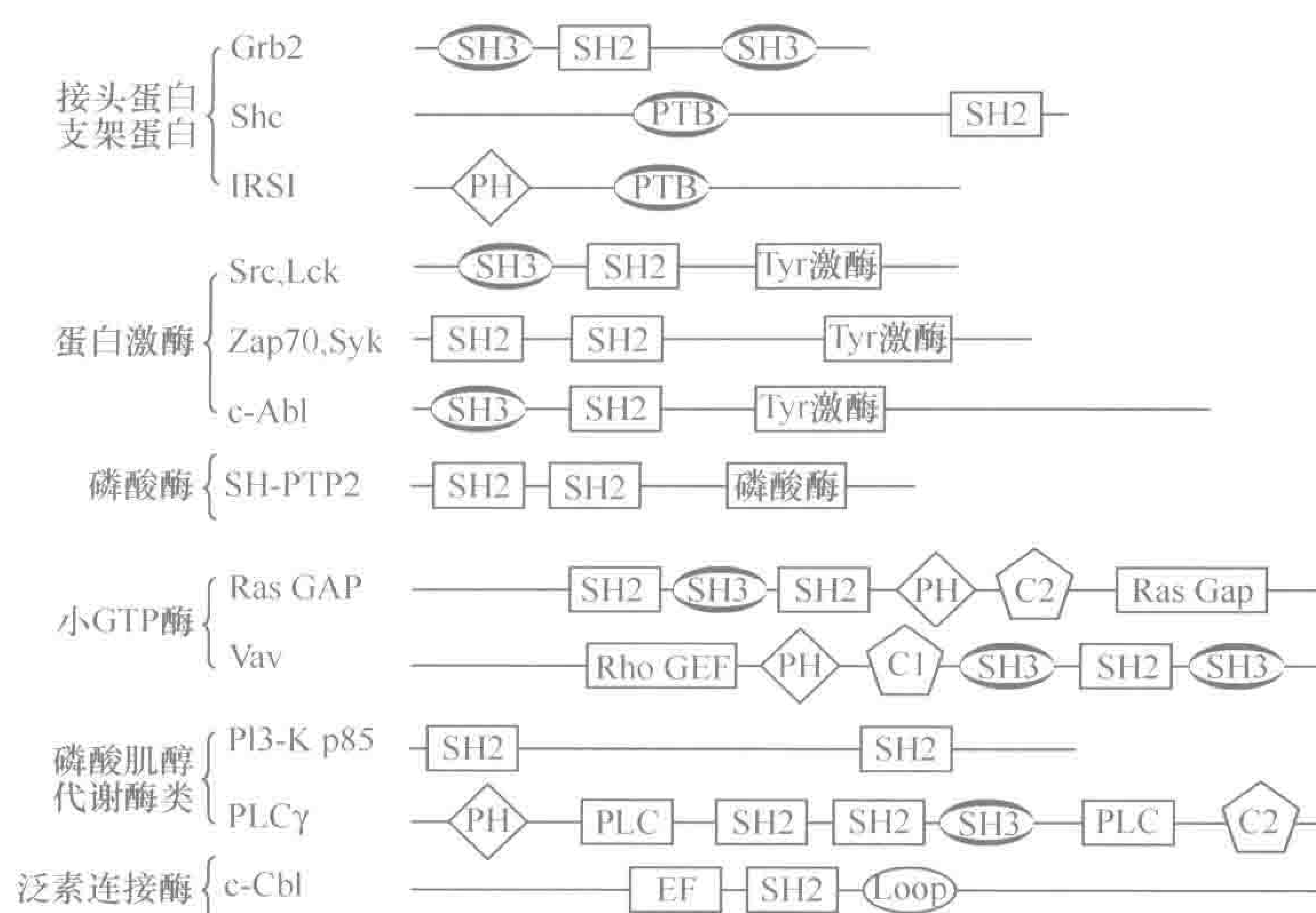


图 28-13　受体酪氨酸激酶的效应蛋白及其结构

1）接头蛋白（adaptor protein）和支架蛋白（scaffolding protein）：如生长因子受体结合蛋白-1（Grb-2）、Shc 和 IRS1 等，其本身没有酶活性，也不具备信号传递的性质，但能够介导活化受体与其他信号分子的偶联，参与构成信号转导复合体。

2）非受体酪氨酸激酶：如 Src、Abl、Lck、Zap70 和 Syk 等，通过催化下游蛋白的酪氨酸残基磷酸化，介导信号进一步传递。

3）酪氨酸特异性蛋白激酶：如 SH-PTP2，可引起激活型受体酪氨酸激酶的磷酸化酪氨酸残基的去磷酸化，抑制受体活性和下游信号转导。

4）小 GTP 酶信号蛋白：如 Ras 信号通路中的 GTP 酶活化蛋白 GAP。GAP 可使 Ras 蛋白的 GTP 水解速率提高 10 万倍，缩短有活性的 GTP 结合状态，从而负向调控 Ras 蛋白和 Ras 相关蛋白。

5）磷脂酰肌醇代谢相关的酶：如磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3-K）的 p85 亚基和磷脂酶 C-γ 等。通过结合活化受体，到达细胞膜进入底物附近区域。

6）具有泛素连接酶活性的蛋白 Cbl，含有与活化受体结合的结构域和具有泛素连接酶活性的指状结构，介导受体的泛素化降解。

效应蛋白通过一些特定的结构域与活化受体的磷酸化酪氨酸残基（或相邻序列）发生相互作用。这种蛋白质-蛋白质相互作用构成了信号转导的基础。主要包括 SH 结构域和 PTB 结构域。

SH 结构域即 Src 同源结构域（Src homology domain，Src 是一种癌基因，最初在 Rous sarcoma virus 中发现）。其中 SH2 大约由 100 个氨基酸组成，能够识别靶蛋白中

的磷酸化酪氨酸残基及其周围氨基酸残基组成的特殊结构域，并与磷酸化酪氨酸的磷酸基团结合。SH3 结构域能够识别富含脯氨酸和疏水残基的特异序列的蛋白质并与之结合。不同蛋白质分子含有结构相似但并不相同的 SH 结构域，因此对于含有相应识别氨基酸的不同结构域具有选择性。含有 SH2 结构域的效应蛋白与活化的 RTK 结合后，通过膜定位激活、酪氨酸磷酸化激活、变构激活的方式被活化，进一步介导信号传递。

PTB 结构域又称磷酸化酪氨酸结合结构域（phosphotyrosine binding domain），由约 160 个氨基酸组成，与 SH2 一样，PTB 结构域也可以识别一些含磷酸酪氨酸的基序，但其结合基序与 SH2 结构域有所差别。PTB 结构域主要存在于接头蛋白中，可以将其他信号蛋白募集到活化受体的附近。

（三）受体酪氨酸激酶介导的信号转导通路

参与生长因子受体胞内信号转导的通路至少有 3 条。

1. Ras 通路

RTK 结合信号分子，形成二聚体，并发生自磷酸化而活化，活化的 RTK 激活 Ras，由活化的 Ras 引起蛋白激酶的磷酸化级联反应。Ras 蛋白要释放 GDP，结合 GTP 才能激活，GDP 的释放需要鸟苷酸交换因子（GEF，如 Sos）参与；Sos 没有 SH2 结构域，因此不能直接和受体结合，需要接头蛋白（如 Grb2）的连接，接头蛋白通过 SH2 与受体的磷酸酪氨酸残基结合，再通过 SH3 与 Sos 结合，Sos 与膜上的 Ras 接触，从而活化 Ras。Ras 本身的 GTP 酶活性不强，需要 GTP 酶活化蛋白（GAP）的参与，使 Ras 结合的 GTP 水解而失活，GAP 具有 SH2 结构域可直接与活化的受体结合。

Ras 蛋白与 Raf 的 N 端结构域结合并使其激活，Raf 是丝氨酸/苏氨酸（Ser/Thr）蛋白激酶（又称 MAPKKK），活化的 Raf 结合并磷酸化另一种蛋白激酶 MAPKK，使其活化。MAPKK 又使 MAPK 的苏氨酸和酪氨酸残基使之激活。MAPK（mitogen-activated protein kinase）属丝氨酸/苏氨酸残激酶。活化的 MAPK 进入细胞核，可使许多转录因子活化，如激活 Elk-1，促进 c-fos、c-jun 的表达等。

RTK-Ras 信号通路可概括如下：配体→RTK→adaptor→GEF→Ras→Raf（MAPKKK）→MAPKK→MAPK→进入细胞核→转录因子→基因表达（图 28-14）。

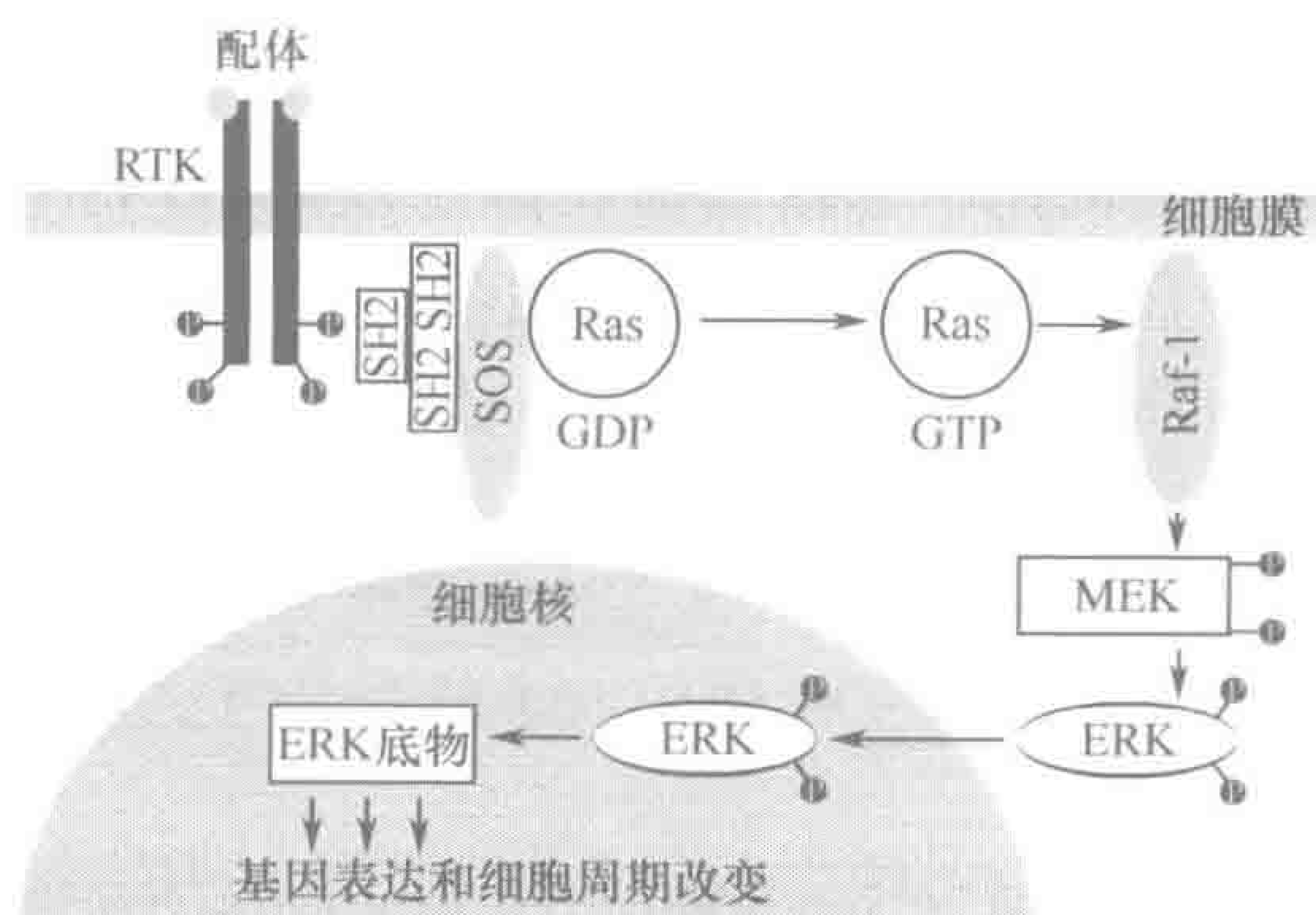


图 28-14 RTK-Ras-MAPK 信号途径

2. PLC-γ 通路

PLC-γ 是磷脂酶 C 同工酶中的一种，其结构中也含有 SH2、SH3 成分。它被 RTK 激活后就将细胞膜上的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸（PIP2）水解成肌醇-1,4,5-三磷酸（IP3）和 DAG。IP3 是水溶性的，进入胞质，激活内质网上的钙通道，将钙离子从内质网释放进入胞液中。DAG 是脂溶性的，留在胞膜内，激活 PKC，PKC 可促使 Na^+/H^+ 交换，提高细胞内的 pH。

3. PI3-K 通路

PI3-K 除可被 Gβγ 复合物激活外，还可被活化的 RTK 激活，从而使该通路活化。

五、非受体酪氨酸激酶及其信号转导

非受体蛋白酪氨酸激酶是一类很重要的家族，与受体酪氨酸激酶不同，其胞质区无酪氨酸激酶活性。配基结合后激活细胞中一种或多种非受体蛋白酪氨酸激酶（non-receptor protein tyrosine kinase，nPTK）作为激酶催化亚单位，通过细胞内酪氨酸磷酸化传递信号。这些非受体蛋白酪氨酸激酶通常与受体永久结合，配基与受体结合后被激活；或者作为一种可溶性成分存在于胞质中，当受体与配基结合后再与受体结合并激活。非受体蛋白酪氨酸激酶可分为 9 个家族和 4 个不属于任何一种已知家族的额外非受体蛋白酪氨酸激酶（图 28-15）。非受体蛋白酪氨酸激酶的募集以及随后的酪氨酸磷酸化是信号向细胞内部转导的起始点。前几章叙述的是信号向下游进一步传递的机制。

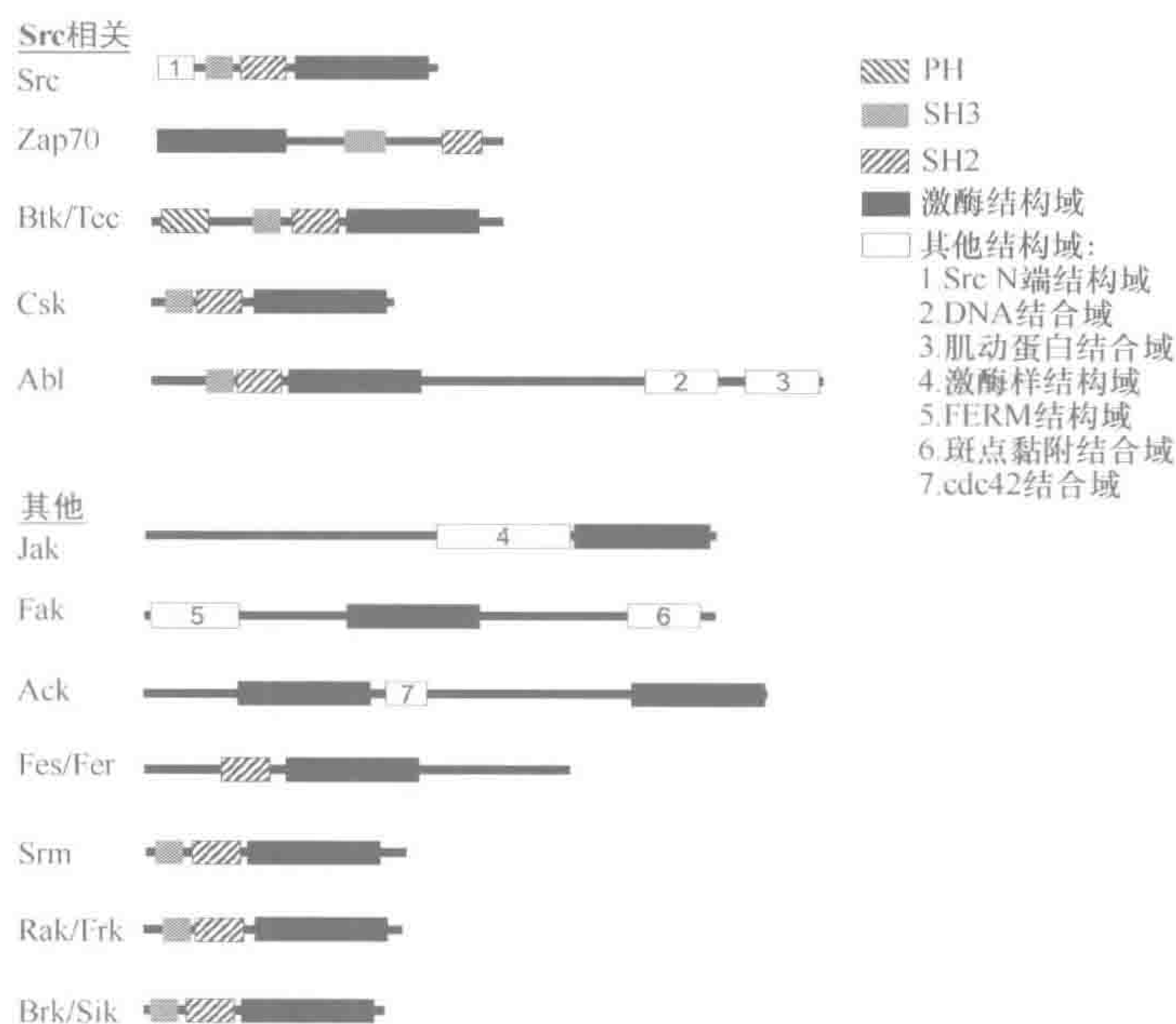


图 28-15　非受体蛋白酪氨酸激酶家族

介导免疫和炎症反应的非受体蛋白酪氨酸激酶相关的受体有：T 淋巴细胞受体（T lymphocyte receptor，TCR）、B 淋巴细胞受体（B lymphocyte receptor，BCR）、白细胞介素 2 受体（interleukin-2 receptor，IL-2R）、免疫球蛋白受体（immunoglobin receptor）、促红细

胞生成素受体（erythropoietin receptor）、催乳激素受体（prolactin receptor）等。

（一）细胞因子受体的信号转导

细胞因子受体是一类单链跨膜多肽，具有特征性的胞外配体结合区及胞质区。不同的受体类型由胞外区的特殊序列决定。细胞因子受体的亚基结构变异很大，下面以具有代表性的 IL-2 受体来介绍受体亚基结构、配体结合以及酪氨酸激酶活化之间的相互作用。

1. 细胞因子受体的结构及活性

IL-2 信号传递需要 3 个受体亚基，IL-2Rα、β 和 γc。α 亚基的作用是调节亲和性结合，另外 2 个亚基与配基高亲和性结合必须有 α 亚基的存在，否则只有中度的亲和力。Il-2Rβ 和 γc 的异二聚体化是形成功能性 IL-2R，并有效传递信号所必需的，同时也是募集细胞内那些与 β、γc 亚基偶联的信号分子所必需的。IL-2Rβ 和 γc 都未发现有内在的酪氨酸激酶活性或其他酶活性，但与 IL-2 结合后其所偶联的胞质酪氨酸激酶被激活，信号则进一步向下传递，而被激活的受体实际上没有发挥任何酶功能。

2. 胞质酪氨酸激酶的激活

配基结合到细胞因子受体后，可观察到不属于受体蛋白质的酪氨酸激酶激活。这种酪氨酸激酶一般与受体的一个亚基永久结合，配基诱导的受体重构或异寡聚化则激活这种酪氨酸激酶。与细胞因子受体亚基结合的酪氨酸激酶多数属于 Janus 激酶（Jak）家族。Src 家族的蛋白酪氨酸激酶，如 Lck、Fyn 和 Tyk 也被证明是细胞因子受体的直接下游组分（图 28-16）。

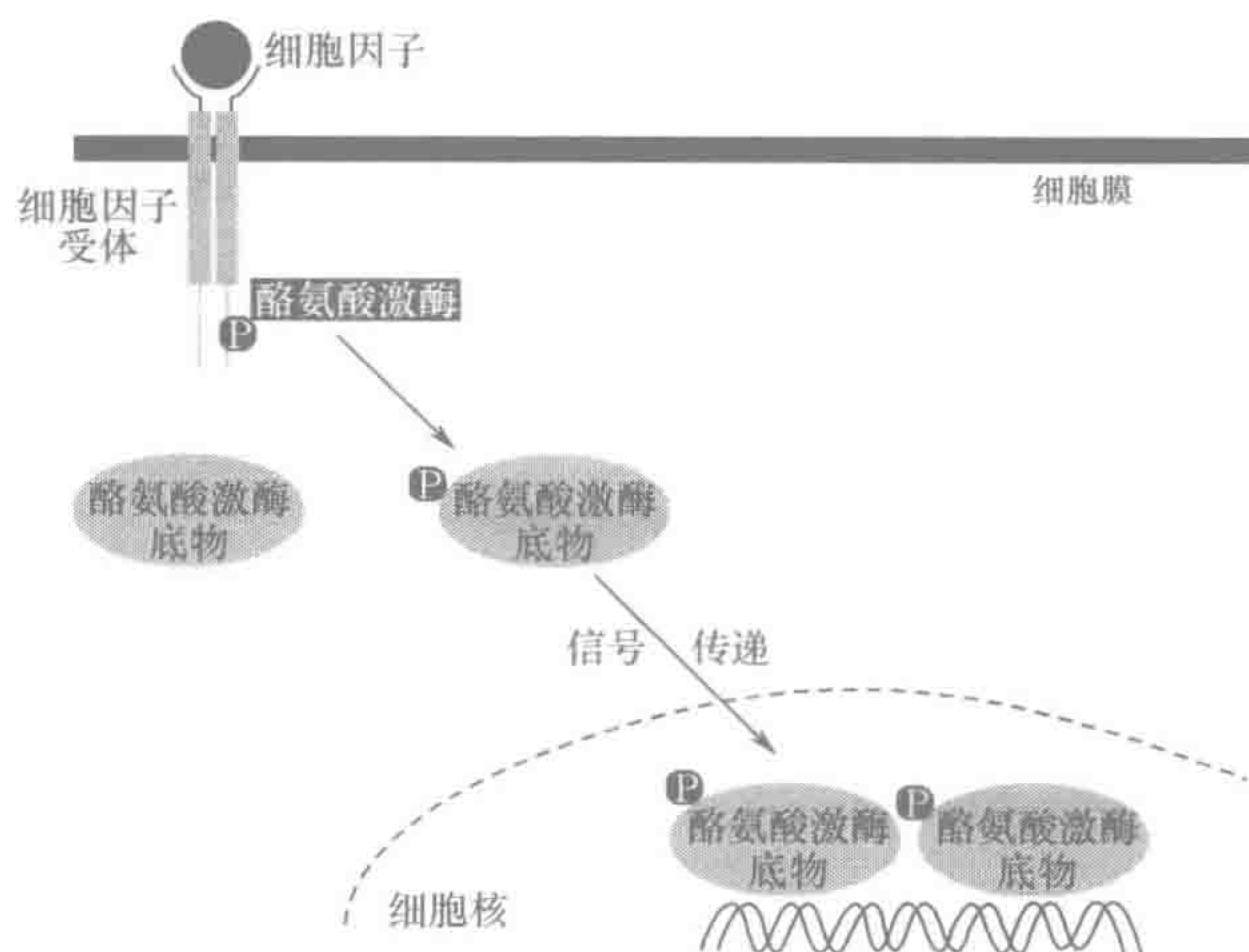


图 28-16　细胞因子信号转导步骤

细胞因子受体的信号传递涉及以下步骤：细胞因子与受体胞外配基结合域结合后激活相关酪氨酸激酶（如 Jak1）。相邻激酶分子酪氨酸之间发生交互磷酸化。激活的受体激酶也可催化受体细胞内区域的 Tyr 磷酸化。磷酸化酪氨酸残基成为中继蛋白或其他效应蛋白的附着点，进一步向细胞内传递信号。

1）相关酪氨酸激酶的自磷酸化激活。这一步是配基结合之后，以自磷酸化方式激

活相关酪氨酸激酶，与受体寡聚体连接的相邻的酪氨酸激酶之间交互磷酸化，发生在酪氨酸激酶的催化环中。

2）受体亚基磷酸化。激活的酪氨酸激酶磷酸化胞内侧受体亚基的酪氨酸残基，为募集其他信号蛋白提供附着点。

3）其他信号蛋白结合。不同磷酸酪氨酸残基为含有 SH2 的磷酸酪氨酸结合区或 PTB 区的信号蛋白质提供位点。中继蛋白如 Shc 或 IRS 以这种方式被募集到细胞因子受体，从而信号传递至细胞内不同的信号通路。

4）底物磷酸化。连接到激活受体上的信号蛋白一般是活化的酪氨酸激酶的底物，如 Stat 蛋白、Shc 中继蛋白和 PI3-K。IL-2Rβ 通过诱导 PI3-K 的调节亚基 p80 的酪氨酸磷酸化，将 PI3-K 募集到细胞膜，从而激活 PI3-K。

仍旧以 IL-2 为例。IL-2 信号传递主要通过 IL-2Rβ 亚基。Lck、Jak、Syk、Pyk-2，Src 家族激酶都与 IL-2Rβ 偶联。多数特异性信号受 Jak1 介导。在无 IL-2 刺激时，Jak1 与 IL-2Rβ 链偶联；Janus 激酶家族的另一成员 Jak3 可与 IL-2Rγc 亚基形成稳定结合。IL-2 介导其受体异二聚体化后，触发 Jak3 被大量募集，并激活 Jak1 和 Jak3。Jak1 和 Jak3 相互磷酸化，并使受体发生酪氨酸磷酸化，从而使受体的磷酸化酪氨酸残基成为 STAT 蛋白的引入位点。STAT 蛋白自身被 Jak 激酶磷酸化，活化的 STAT 蛋白从受体的引入位点解离，然后发生 STAT 蛋白二聚体化。STAT 二聚体转移到细胞核中，与其 DNA 结合位点结合，开始调控靶基因的转录。Jak1 还可诱导中继蛋白 Shc 的 Tyr338 磷酸化，随即形成 Grb-mSOS 复合体；随后激活 Ras，信号被传递到 Ras 通路。另一个效应蛋白 PI3-K 通过其 p85 调节亚基的 SH2 区，被 Jak1 募集并活化，活化的 PI3-K 进一步激活其下游的激酶，如蛋白激酶 B 及 p70S6 激酶，参与 IL-2 介导的抗凋亡和细胞增殖应答过程。

起始于非受体酪氨酸激酶的信号根据受体类型，由不同的通路进一步向下传递：①Jak-Stat 通路；②Ras 通路；③MAP 激酶通路；④经由磷脂酶 C-γ 的蛋白激酶 C 通路；⑤PI3-K 通路。

3. 细胞因子受体信号传递的负调节

细胞因子受体活性是受到严格调控的，其目的是避免受体被持续激活和信号过强，终止和衰减细胞因子受体的信号传递的机制如下：①募集蛋白酪氨酸磷脂酶；②经由泛素-蛋白酶体（ubiquitin-proteasome）途径的降解；③募集抑制蛋白如 SOCS（supressor of cytokine signalling，细胞因子信号释放抑制物）蛋白。

SOCS 是目前已经确认的可负调节细胞因子传递信号的蛋白家族。迄今为止，已鉴定了 5 个 SOCS 亚家族。SOCS 蛋白拥有一个保守序列基序——SOCS 盒，以及 SH2 结构域或激酶抑制区（KIR）等其他功能域。大量细胞因子刺激 SOCS 的 mRNA 产生，对细胞因子信号的传递发挥负调节作用。因此，SOCS 蛋白可以阻断刺激其本身的信号通路，这是一种经典的负反馈环路。

（二）T 细胞和 B 细胞抗原受体的信号转导

T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞表面有特异性受体，可以与抗原结合并激活细胞内信号

通路，与细胞分裂、程序性死亡或淋巴细胞功能重建有关。B 细胞和 T 细胞抗原受体与抗原结合过程差异很大，但激发的信号链和启动的反应非常相似。

T 细胞和 B 细胞抗原受体没有内源性蛋白酪氨酸激酶活性。然而，抗原结合诱导受体胞内侧 Src 家族（Lck,Fyn 激酶）的蛋白酪氨酸激酶的激活。这些激酶与 TCR 复合体结构组成性结合，配基与受体结合后被激活，但激活机制不详。紧随这一早期激活步骤，ITAM 被磷酸化，并为 Syk 家族激酶（Syk,ZAP70 激酶）结合提供锚着位点。ZAP70（ζ 结合蛋白 70）激酶借助其 SH2 结合到上述形成的磷酸化酪氨酸残基上，然后被磷酸化激活。信号传递级联反应的下一步是称作 T 淋巴细胞激活连接物（linker for activation of T-lymphocyte，LAT）的中继蛋白被 ZAP70 磷酸化。LAT 是位于细胞膜的富含糖脂类区域的跨膜蛋白。继而其他不同的信号蛋白直接或间接地通过 SH2 与 LAT 的磷酸化酪氨酸残基募集至 TCR 信号转导通路（图 28-17）。这些信号蛋白包括 PLC-γ 和诸如 Grb2 的中继蛋白，后者进一步将 GEF（mSOS，Vav）和非受体酪氨酸激酶（Tec）聚集到 TCR-信号传递级联反应中。

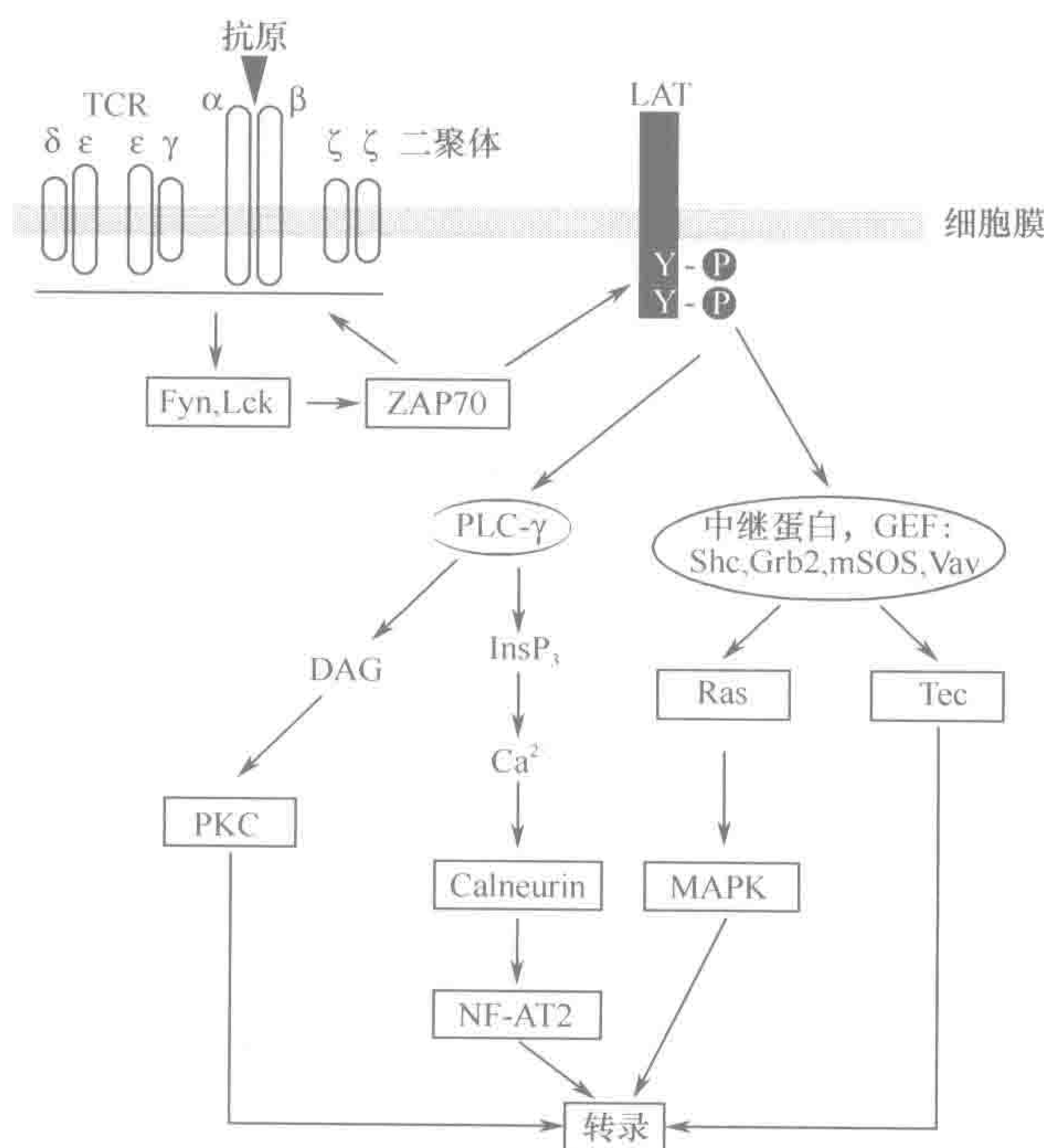


图 28-17　淋巴细胞激活有关信号通路

淋巴细胞活化的激发信号通常是抗原与 T 细胞受体结合。活化的受体将信号传递给结合非受体酪氨酸激酶，如 Fyn、Lck 和 ZAP70。后者磷酸化跨膜蛋白 LAT 的 Tyr，为中继蛋白（Shc 和 Grb2）和 GEF 提供锚着点，中继蛋白和 GEF 将信号传递给 Ras/MAPK 通路或非受体型酪氨酸激酶 Tec，进而 PLC-γ 募集到 LAT，从而产生 Ca^{2+}/DAG 信号，通过 calneurin/NF-AT2 至靶基因转录激活 PKC。DAG：二酰甘油；$InsP_3$：1,4,5-三磷酸肌醇

由 Csk 激酶介导的酪氨酸激酶 Lck 和 Fyn 的抑制型磷酸化对于信号转导也很重要，发生在 Lck 的 C 端，抑制方式类似于前述 Src 激酶。

T 细胞受体刺激后激活以下信号转导通路：①MAPK 级联反应的 Ras 通路；②PtIns 磷酸盐的水解，通过 PLC-γ；③Ca^{2+}-信号通路，通过 $InsP_3$ 受体的磷酸化和 PLC-γ。

六、脂筏与 T 细胞信号转导

脂筏（lipid raft）是一种细胞膜上含有特殊脂质的动态可变微区（图 28-18，见书后彩图）。微区内富含鞘糖脂、鞘磷脂、胆固醇以及多种 GPI 锚蛋白。鞘脂的富集使脂筏具有不溶于非离子型去垢剂的特点，而胆固醇主要参与脂筏的形成。脂筏分散在细胞膜上，能侧向漂移，有利于蛋白质之间的相互作用和构象的变化，是细胞行使质膜运输、信号转导和极化等生理功能的平台。运用蛋白质组学的方法分析脂筏中的蛋白成分发现，参与 T 细胞激活信号级联的多种蛋白成分皆定位于脂筏。携带有信号转导元件的脂筏可通过细胞骨架肌动蛋白进行组装，形成信号转导机器参与 T 细胞的信号级联。

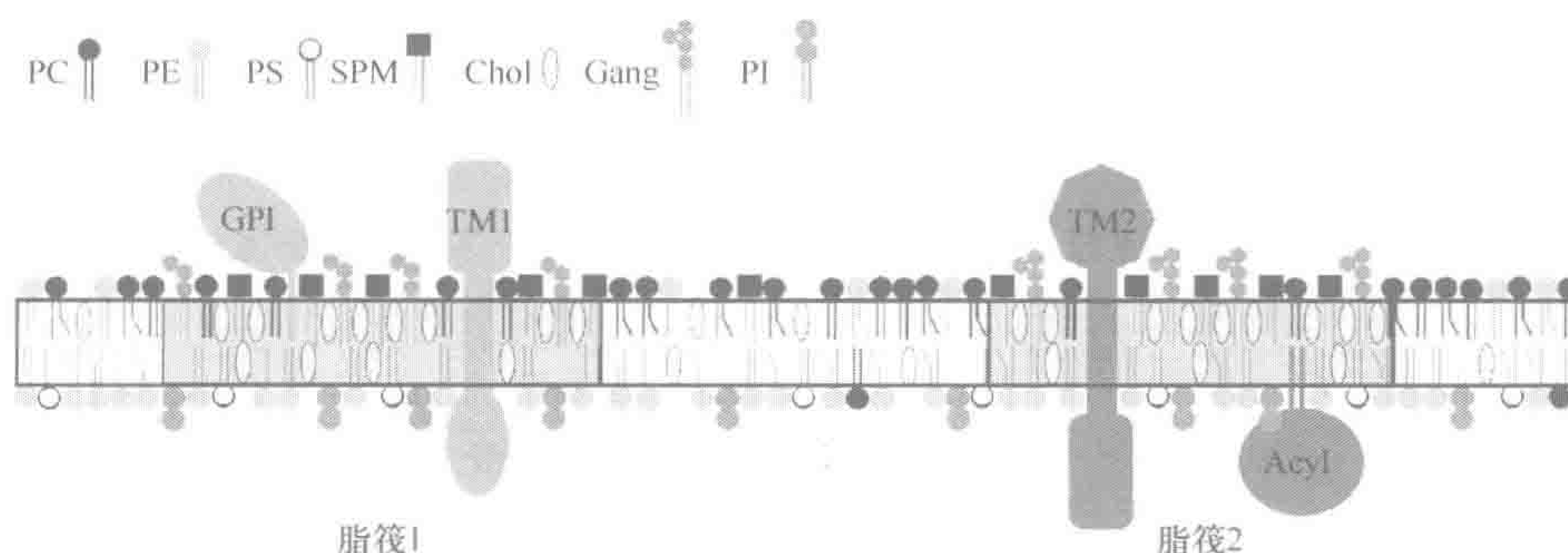


图 28-18　脂筏的结构

脂筏（灰色区域）；Chol：胆固醇；Gang：神经节苷脂；SPM：鞘磷脂；PC：卵磷脂；PE：磷脂酰乙醇胺；PS：磷脂酰丝氨酸；PI：磷脂酰肌醇；Acyl：二酰化蛋白；TM：跨膜蛋白；GPI：糖基磷脂酰肌醇

（一）关键信号分子在脂筏中的定位

在 T 细胞信号转导中发挥重要作用而且存在于脂筏中的蛋白质有 LAT、CD4 和 CD8。与脂筏外叶相关的 GPI 联结的免疫受体有 LPS 受体 CD14、Fc 受体 CD16、黏附/共刺激分子 CD48 和 CD58 等。

还有一类定位于脂筏上的分子是 Lck 激酶。Lck 激酶属 Src 激酶家族成员，具有一个将自身定位到脂筏上的 N 端结构域，其 Gly2 能被豆蔻酰化，Cys3 和 Cys5 分别能被棕榈酰化，这 3 个疏水基团足以将 Lck 锚定到脂筏的胞质半叶。N 端结构域下游是 Lck 的一个独特结构域，其中的 Ser59 能被 ERK 和 MAP 激酶磷酸化，磷酸化的 Ser59 能够决定 Lck 与何种伴侣蛋白结合。Lck 的 SH2 和 SH3 结构域主要参与蛋白质之间相互作用和分子内的相互作用。Lck 的催化结构域和 C 端结构域各有一个关键的 Tyr，两个 Tyr 的磷酸化状态对 Lck 活性的调节具有重要作用。当 C 端的 Tyr505 被磷酸化后，能与分子内的 SH2 结构域相互作用使 Lck 折叠成一种闭合的低活性状态，而催化结构域中的 Tyr394 的磷酸化能使 Lck 去折叠形成一种开放的高活性构象。Csk（C-terminal Src kinase）能使 Tyr505 磷酸化降低 Lck 的活性，而 CD45 能使 Tyr505 去磷酸化增强 Lck 活性，但同时也能使

Tyr394 去磷酸化，产生负调控。用非离子型去垢剂处理 Jurkat T 细胞，得到的裂解物分为可溶和不可溶两部分，分析发现 25%～50% 的 Lck 能与脂筏共同被纯化出。上述结果表明，Lck 在脂筏上的定位对 T 细胞的信号转导具有重要作用。

定位于脂筏上的接头蛋白特点是共同含有一个将其定位于脂筏上的模体（C-X-X-C，C=Cys，X=任意氨基酸）。Cys 被棕榈酰化后接头分子被锚定于脂筏上。LAT 是一种信号转导中的接头蛋白。如果 LAT 膜近侧的 Cys 被替换，LAT 将不能定位于脂筏，ITAM 磷酸化后的下游信号事件将不能进行。另外两种定位于脂筏的接头分子是 PAG/Cbp（protein associated with GEM/Csk binding protein）和 LIME（lck-interacting molecule），它们主要功能是参与信号转导的调节。辅助受体 CD4 也同样通过近细胞膜侧的两个 Cys 连接的棕榈酰基团以及与 Lck 的相互作用定位于脂筏，它能使脂筏聚集促进信号转导。

（二）脂筏介导的 T 细胞信号转导

T 细胞在静息状态下，TCR 可能排出在脂筏外或与抑制状态的 Lck 相互作用共同存在于脂筏中。持续定位于脂筏的 PAG/Cbp 能被 Lck 激酶磷酸化，磷酸化状态的 PAG/Cbp 能将 Csk 募集至脂筏。Csk 通过 SH2 结构域与 PAG/Cbp 结合形成 PAG/Cbp-Csk 复合物，Csk 能将周围定位于脂筏的 Lck 激酶的 Tyr505 磷酸化，使 Lck 呈闭合的低活性状态，而脂筏以外的 Lck 的 Tyr505 呈去磷酸化状态。同时脂筏中的 LIME 通过与 Lck 的相互作用抑制 Lck 的活性，这样保证了脂筏中的 Lck 呈抑制状态而 T 细胞呈静息状态（图 28-19）。

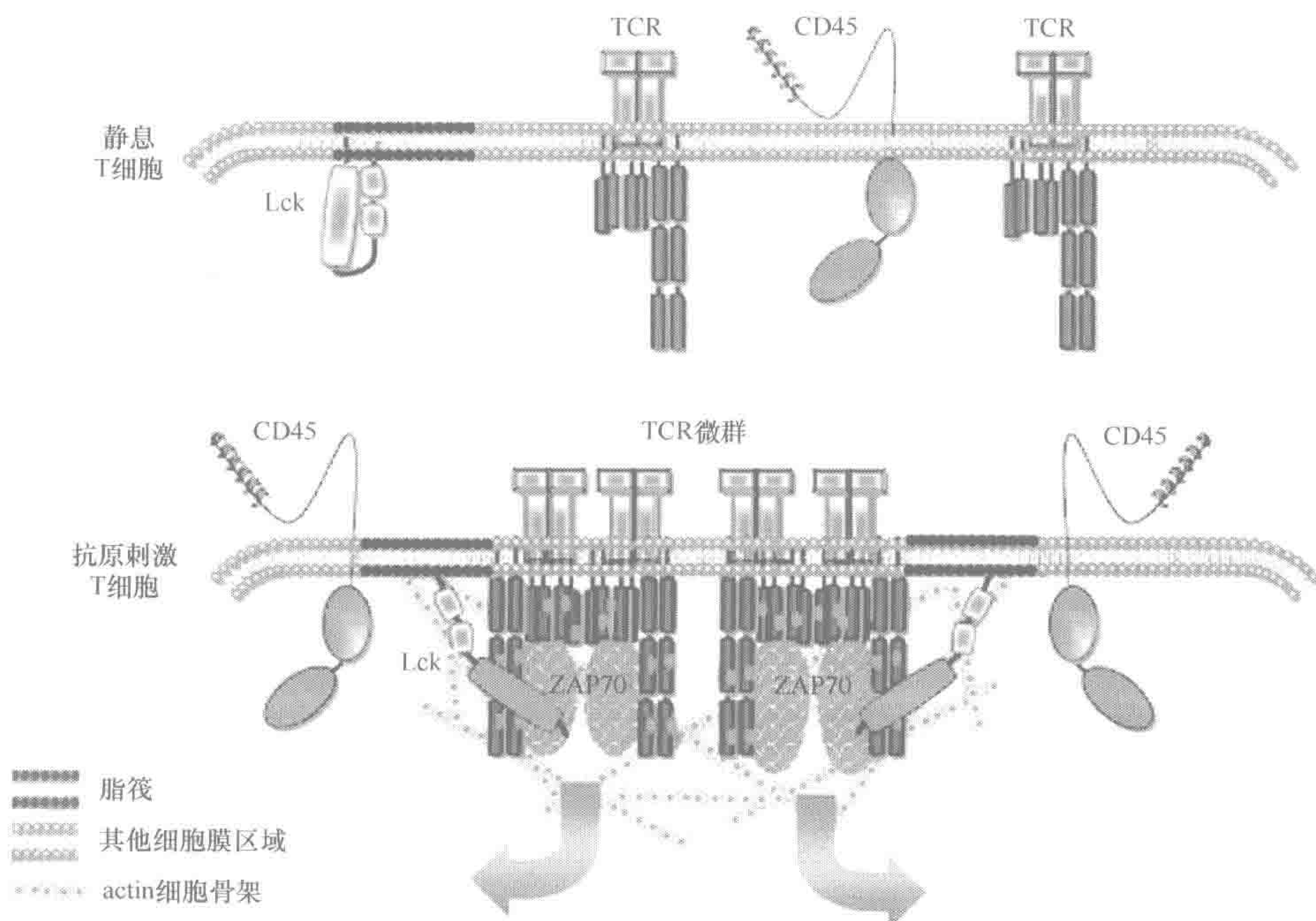


图 28-19　T 细胞激活的早期信号事件

静息T细胞中TCR为单体，TCR与脂筏的相互作用是瞬时的，不能起始信号传递；抗原刺激后，actin细胞骨架的重组引起TCR形成微群，降低了脂筏的流动性，因而有利于发生稳固的相互作用。同时，脂筏中Lck的活性增加。上述变化引起ITAM的磷酸化并导致信号转导的起始。

APC将加工处理后的抗原通过MHC分子提呈给T细胞，TCR进入脂筏有两种可能的机制：抗原的结合使TCR构象发生变化从而增加了对脂筏的亲和力；抗原-MHC复合物与脂筏中的少部分TCR的接触引起大量携带有TCR的脂筏聚集到免疫突触，组装成较大的携带多量TCR的脂筏参与对抗原的识别。此外，CD4与MHC的结合以及CD28与B7的结合能够通过加强脂筏在免疫突触中的聚集来放大和延长信号的传递，但CD8却不能引起像CD4一样的脂筏聚集，提示可能CD8辅助受体促进T细胞激活的方式和CD4不同。TCR的激活引起携带有CD45磷脂酶的脂筏进入免疫突触与TCR所在的脂筏聚集，CD45使PAG/Cbp去磷酸化，导致Csk的停靠位点消失，Csk被驱出脂筏，CD45使Lck的Tyr505去磷酸化，使Lck由闭合构象转变为伸展的高活性构象。当Lck活性上调后，CD45迅速被驱出脂筏，因为CD45不仅能使Tyr505去磷酸化，也能使Tyr394去磷酸化，导致其活性下降。成熟的免疫突触中检测不到CD45的存在，所以CD45对Lck具有正调控和负调控两个方面。具体如何保证正调控的优先进行尚不清楚。因此，携带有CD45的脂筏进入免疫突触的动力学参数是决定T细胞激活阈值的关键因素。

Lck激活后能够使CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ的ITAM磷酸化。磷酸化的ITAM募集ZAP70，ZAP70被激活后使定位于周围脂筏的LAT磷酸化。携带有磷酸化LAT的脂筏作为一个信号的发送平台将信号分3条通路发送：Ras-Map激酶通路、钙磷酸酶通路以及蛋白激酶C通路，它们分别激活AP-1、NFAT和NF-κB 3种转录因子入核启动相关基因的表达。

（三）脂筏与T细胞信号转导调控

PAG/Cbp定位于脂筏可以使Lck的活性得到抑制。磷酸化的PAG/Cbp能募集Csk进入脂筏与之结合，Csk使周围的Lck激酶的Tyr505磷酸化，使Lck处低活性状态。此外，PAG/Cbp也能控制Lck的活性，避免Lck过度激活。激活的Lck一方面能使ITAM磷酸化；另一方面也能使周围脂筏中的PAG/Cbp磷酸化，Csk重新被募集到脂筏与磷酸化的PAG/Cbp结合，使周围高活性的Lck的Tyr505磷酸化，使之重新回到低活性状态，所以PAG/Cbp定位于脂筏不仅能保证静息状态下TCR所在脂筏周围的Lck呈低活性状态，同时也为Lck活性提供了一个负反馈调节。B磷酸化的LIME能与Csk结合，从而促进Csk与PAG/Cbp的结合。原因可能是LIME与Csk的结合能够首先将Csk定位到脂筏，从而利用脂筏带来的“近侧效应”Csk能就近结合到同一脂筏中的PAG/Cbp。Lck的活性除上述两种调节方式外，还能通过Lck的泛素化使其通过蛋白酶体降解从而进行调节。上述事实提示，Lck的活性是短暂的，其活性就维持在PAG/Cbp被CD45去磷酸化和被激活的Lck重新磷酸化的这一段“窗口期”。CTLA-4对T细胞激活的负调节与脂筏也有密切关系。当T细胞激活后，CTLA-4在脂筏中表

达与 CD3ζ 链相互作用，通过与 CD3ζ 的作用控制 CD3ζ 与脂筏的亲和性以及 CD3ζ 在脂筏中的积累。

（四）脂筏在 T 细胞激活过程中的意义

1972 年，Singer 和 Nicholson 提出了细胞膜的“流动镶嵌模型”，他们认为细胞为一个均一的二维液相，膜蛋白镶嵌于其中。而脂筏的发现使人们重新认识了细胞膜的结构。脂筏是动态可变的，其大小成分都是变化的，它能产生侧向运动和使细胞膜区域化。脂筏在 T 细胞信号转导过程中发挥了 3 种功能：第一，在 T 细胞表面形成“信号单元”。T 细胞表面的每一块脂筏即一个信号单元，携带一定量的信号转导元件，如 TCR-CD3 复合物、Lck、PAG/Cbp、LAT 等。在静息状态下，PAG/Cbp-Csk 和 LIME 能使定位于同一脂筏上的 Lck 呈抑制状态，而对不同脂筏上的 Lck 的作用不太显著。这种“区域自治”对静息状态的维持相对于无脂筏的“混乱状态”来说为更为有效和有序。当有抗原提呈时，不同的“信号单元”能被募集至免疫突触，组装成“信号体”执行信号转导功能，保证信号起始的有序性。第二，脂筏具有“信号平台作用”。在信号转导过程中，各种信号转导元件之间通常要进行相互结合、相互修饰。脂筏的存在使这些作用仅限于此平台内，避免与外界的其他蛋白质相互作用或避免与其他脂筏上进行的信号转导发生交叉，对信号转导具有保护作用。第三，脂筏能在信号转导过程中产生“近侧效应”。脂筏使参与信号转导的元件定位于筏中，使信号转导过程中涉及的元件间的相互作用具有位置的便利性和高效性。若没有脂筏，不同元件散布于细胞膜中，元件间的相互作用将变得低效。脂筏的出现使 T 细胞信号转导具有相对的模块性和封闭性。

七、受体丝苏氨酸蛋白激酶

细胞除了具有内在酪氨酸蛋白激酶活性的跨膜受体外，还含有内在丝氨酸（Ser）/苏氨酸（Thr）激酶活性的跨膜受体，又称受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。转化生长因子 β（transforming growth factor β，TGF-β）家族的受体就属于这一类。这类家族的成员调控着细胞增殖、凋亡、黏附、分化和迁移等诸多功能。

（一）TGF-β 超家族及其受体

TGF-β 是一个分泌型的多肽生长因子超家族，其中包括 TGF-β/Activin 家族和 BMP（bone morphogenetic protein）/GDF（growth and differentiation factor）/MIS（muellerian inhibiting substance）家族等若干亚家族。TGF-β 家族成员通过与特异性受体结合而引发其生物学效应。根据结构与功能的不同，将 TGF-β 超家族的受体分为 2 个亚型，即Ⅰ型及Ⅱ型受体（TβR-Ⅰ和 TβR-Ⅱ）。其结构基本相似，均为糖蛋白，分子质量分别为 55kDa 和 70kDa。都由富含半胱氨酸的胞外区（N 端）、跨膜区及含丝氨酸/苏氨酸激酶结构域的胞内区（C 端）组成。

Ⅰ型受体的成员有 ActR-ⅠB、TβR-Ⅰ、ALR7、ATR1 以及 BMPR-1A 等。该类受体胞外近膜区有保守的由 9 个氨基酸残基组成的半胱氨酸富含区，具有亲水性。胞内区含有一个高度保守的特征性结构——GS 基序（TTSGGSGSGLP），且紧邻蛋白激酶区的

第一个氨基酸残基，此结构为 TβR-Ⅰ所特有。受体与 TGF-β 结合后 GS 基序可被Ⅱ型受体磷酸化，对于 TβR-Ⅰ的激活起至关重要的作用。在 GS 区旁有 L45 环，它能和 Smad 蛋白的 MH2 区的 L3 环特异性地结合（见下文）。Ⅱ型受体除 TβR-Ⅱ外，还包括 ActR-Ⅱ、Punt 及 BMPR-Ⅱ等。Ⅱ型受体胞内区和胞外区较Ⅰ型受体长，不包含 GS 基序，具有不依赖配体的组成型激酶活性，与配体结合后与 TβR-Ⅰ形成寡聚体（图 28-20）。一般来讲，Ⅰ型受体较为保守，而Ⅱ型受体则变异较大。

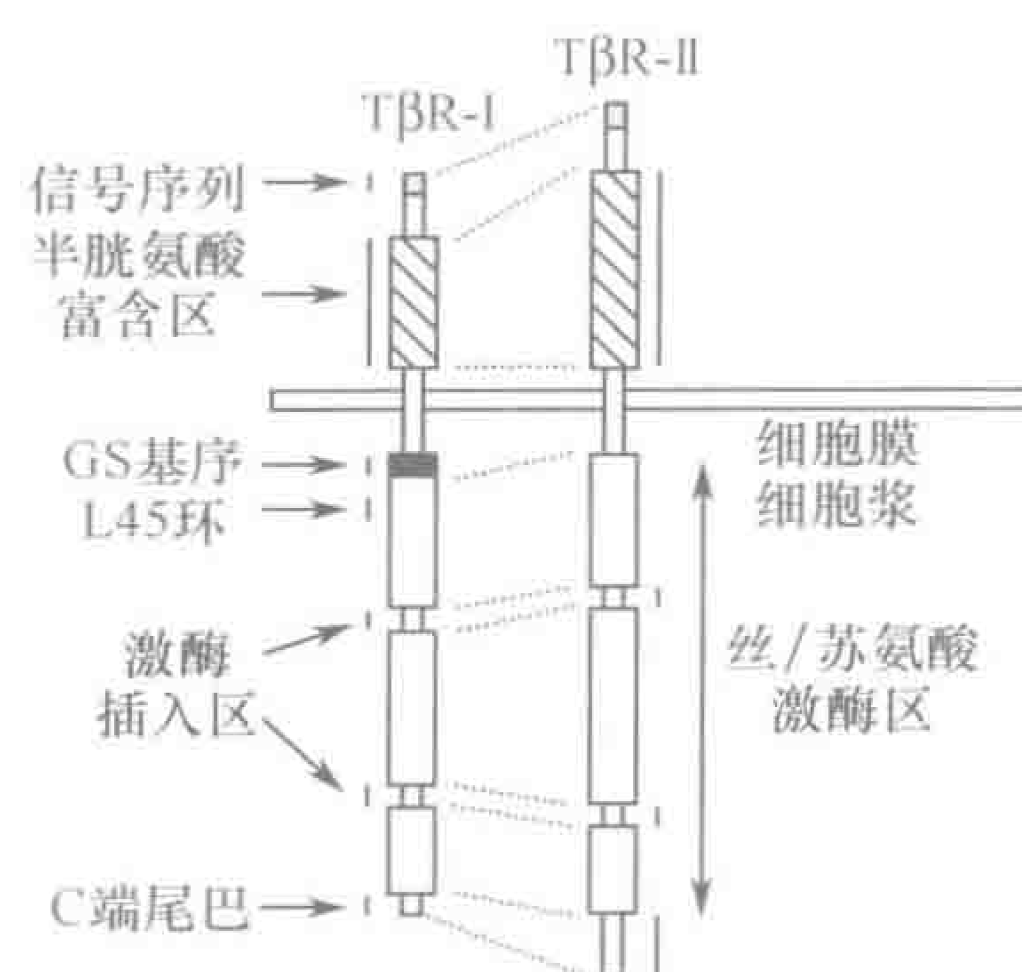


图 28-20　TGF-β 受体结构

（二）Smad 蛋白

哺乳动物中介导 TGF-β 信号转导的是一系列独特的转录因子，称为 Smad 蛋白。Smad 蛋白可选择性地与两种 TGF-β 受体结合，从而发挥不同的功能。Smad 蛋白有两个保守的结构域：N 端的 MH1（Mad Homology）区和 C 端的 MH2 区。MH1 和 MH2 非活化状态下相互作用，形成自我抑制，被受体活化后，分子打开，形成异源复合物，转移到核内，与一些调节蛋白相互作用，从而调节转录。Smad 信号蛋白家族按作用特点与结构特征分成 3 类。

1）受体调节型 Smad 蛋白（R-Smad，Smad 1、2、3、5、8）：这类 Smad 蛋白 C 端 SSXS 特异序列能被Ⅰ型受体磷酸化（3 个丝氨酸中有 2 个发生磷酸化）并被激活。

2）共同介质型 Smad 蛋白（Co-Smad，Smad 4）：C 端缺乏 SSXS 序列，因而不能被磷酸化。其 MH1 区有结合 DNA 的序列。在哺乳动物细胞里，它能与磷酸化的 R-Smad 结合形成异源寡聚物，从而进入细胞核，发挥转录因子样作用而调控基因表达。

3）抑制型 Smad 蛋白（I-Smad、Smad 6 和 Smad 7）：抑制型 Smad 蛋白可被 TGF-β1诱导产生，可竞争性地与 TβR-Ⅰ结合，阻止 R-Smad 磷酸化，从而对 Smad 介导的信号转导起反馈调节的作用。Smad 6 抑制 BMP 的信号转导，Smad7 则对 TGF-β 与 BMP 信号转导都有抑制作用。

（三）TGF-β 的细胞信号转导

TGF-β 信号转导首先由 TGF-β 配体结合到细胞表面的 TGF-β 的Ⅱ、Ⅰ型受体，形成异源三聚体，Ⅱ型受体磷酸化Ⅰ型受体的丝氨酸/苏氨酸激酶区而激活Ⅰ型受体，Ⅰ型受体再磷酸化而激活 Smad 蛋白，激活的 Smad 蛋白进入细胞核，和其他的核内转录调节因子结合，调节目的基因的转录（图 28-21）。

1. 配体与受体结合

配体与受体结合有两种不同作用模式，TGF-β/Activin 亚家族分子与Ⅱ型受体亲和力很高。TGF-β 首先结合Ⅱ型受体的胞外配体结合区，Ⅱ型受体再与Ⅰ型受体结合，形成 4 个受体分子加 1 个配体二聚体组成的受体配体复合物。BMP 亚家族的 BMP 配体

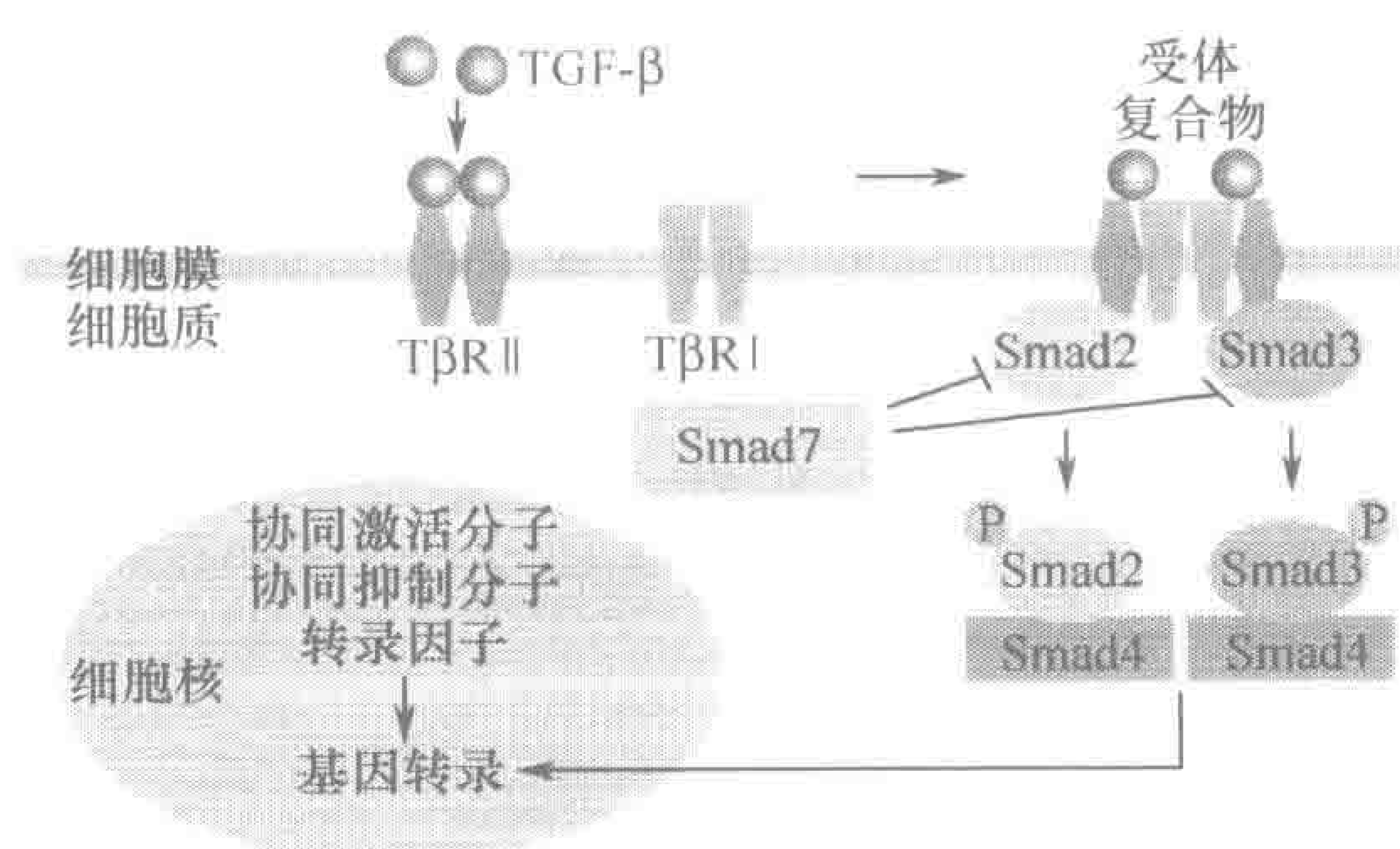


图 28-21　TGF-β 介导的 Smad 细胞信号转导过程

如 BMP2、BMP4，对 BMP Ⅰ型受体亲和力很高，对Ⅱ型受体亲和力很低，BMP 与Ⅰ型受体结合后对Ⅱ型受体则有很高的亲和力。

2. 受体活化

配体和受体的结合诱导受体发生磷酸化而被激活。一般认为Ⅱ型受体的组成型激酶活性可自身磷酸化，处于持续活化状态；活化的Ⅱ型受体磷酸化Ⅰ型受体 GS 区域内的多个丝氨酸/苏氨酸残基，使其活化。

3. Smad 蛋白活化

在静息状态下，未磷酸化的 R-Smad 在细胞质中；当细胞受到 TGF-β 刺激或由于细胞骨架改变引起微管结构发生变化时，Smad2、Smad3 就会与 SARA（Smad anchor for receptor activation）蛋白结合，而被固定在细胞膜附近，促进其磷酸化。SARA 包含一个 PYVE 的磷脂结合域，能和 Smad2、Smad3 表面疏水区相互作用，加速 Smad2 或 Smad3 与受体的结合及磷酸化。磷酸化的Ⅰ型受体 GS 区与 R-Smad 高亲和力结合，导致 R-Smad 的 MH2 区 C 端 SSXS 基序的两个丝氨酸残基磷酸化，使 R-Smad 激活。活化后的 R-Smad 发生变构，从Ⅰ型受体及 SARA 上脱离出来，自身形成同源聚合物或与 Co-Smad 相互作用形成异源聚合物。

4. Smad 蛋白在细胞核内与 DNA 的结合

Smad1、Smad3 的 MH1 区有核定位信号 NLS，在静息状态时，MH1 和 MH2 区相互抑制，NLS 被掩盖；当 Smad1、Smad3 活化后其 NLS 暴露出来，结合 importin β 并入核。Smad2 磷酸化后，MH2 区能在 FG（Phe-GLY）介导下直接结合核孔复合物上的核孔蛋白（CAN/Nup214、Nup153），而直接进出胞核。Smad4 进入核中需要与活化的 R-Smad 结合，Smad4 也能独立于 TGF-β 信号而进行质核穿梭，Smad4 蛋白 MH1 区有核定位信号 NLS，此外 Arg81 残基对入核也起一定作用。

磷酸化的 R-Smad 和 Smad4 入核后以不同的方式来诱导靶基因的转录：①磷酸化的 Smad3 和 Smad4 的 MH1 区可与 Smad 结合元件（Smad binding element，SBE）结合，SBE 序列为 5′-AGAC-3′，在人类基因组中出现的频率极高。Smad 蛋白的 MH1 区可与 SBE 的 3 个碱基结合，再与许多其他的 Smad 蛋白协同因子或抑制因子结合，再与 DNA 结合，就开始了基因的转录调节。其中各种协同及抑制因子，即 Smad 蛋白的伴侣分子（partner），决定了信号的特异性。因此同一 TGF-β 信号在不同的细胞、同一细

胞的不同状态时会诱导出不同的反应。②Smad2 不能直接与 DNA 结合，但可能与其他转录因子结合，再诱导靶基因的转录。③Smad2/3 的 MH2 区还可与一些转录激活因子（如 p300/CBP）结合，而促进靶基因的转录。

5. Smad 转导信号的终止

活化的 R-Smad 在磷酸酶作用下去磷酸化而失活，通过泛素化和蛋白酶介导的降解来中止 Smad 蛋白转导的信号，这些过程主要涉及蛋白酶、Smurf1、Smurf2 与 I-Smad 等。活化的 Smad2 主要以蛋白酶方式降解，Smad1、Smad5 则主要被 Smurf1 泛素化而降解。静息状态下 Smad7 主要位于核内；当有 TGF-β 信号时，Smad7 移位到胞质中，直接结合到 TGF-βⅠ型受体上，阻止 R-Smad 的磷酸化，同时可与 Smurf1、Smurf2 共同介导 TGF-β 受体的泛素化和蛋白酶降解。Smad6 则主要被 BMP 信号诱导出核，它与活化的 Smad1 竞争性结合 Smad4 从而抑制 BMP 信号转导。实际上，Smad2、Smad3 在胞核内激活转录后与 Smurf2 结合，只有少部分被泛素化降解，大部分是去磷酸化后被转移到细胞核外，重新参与信号转导。

八、磷脂酰肌醇-3-激酶、Akt 与信号转导

磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphoinositide-3-kinase，PI3-K）家族成员是一类特异性催化磷脂酰肌醇（phosphatidyl inositol，PI）3′位羟基进行磷酸化的重要激酶，其中最主要的就是 PtdIns（4,5）P_2 被磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3-K）在 3′位进行磷酸化，生成 PtdIns（3,4,5）P_3，再被 PLC 切割生成“第二信使”肌醇-1,4,5-三磷酸［Ins(1,4,5)P_3］和二酰甘油（DAG），从而对细胞的许多基本功能，如生长、趋化现象和糖原合成的调控，发挥调节作用。

（一）PI3-K

PI3-K 家族包括 3 个亚类（Ⅰ～Ⅲ）多种酶，它们在催化亚基大小、结合亚基的性质以及酶活性的调节方面存在差异。这里以第Ⅰ亚类的酶为例。PI3-Kα 是其中研究最多的一种酶，PI3-Kα 是由一个催化亚基（p110α）和一个 85kDa 的调节亚基（p85α）组成的具有接头功能的异源二聚体蛋白。p85α 亚基包含的一个 SH3 结构域、两个 SH2 结构域和两个 Pro 富集结构域发挥着结合组件的功能。在信号转导过程中，PI3-K 通过这些结构域进行特定的蛋白质-蛋白质之间的相互作用。

PI3-K 催化反应的产物 PtdIns(3,4,5)P_3 可以与不同信号蛋白的 PH 结构域结合并促进这些蛋白质与细胞膜的结合和活化。

PI3-K 可通过以下四种途径被激活。

1）与活化的受体酪氨酸激酶之间的相互作用。一些生长因子（如 PDGF 等）与相应受体结合后，引发受体酪氨酸激酶（RTK）二聚化及自身酪氨酸残基磷酸化，磷酸酪氨酸残基与 PI3-K p85 亚基的 SH2 结构相互作用，与此同时 PI3-K 的催化亚基也发生变构作用，导致 PI3-K 活化（图 28-22）。PI3-K 的另外一个结合蛋白是胰岛素受体底物（insulin receptor substrate，IRS）。PI3-K 与 IRS 之间的相互作用将胰岛素信号转导途径与 PI3-K 信号转导途径交联起来。胰岛

素的大部分生理功能是经过 PI3-K/Akt 激酶信号转导途径介导完成的。

2）通过 Ras 信号途径被激活。目前认为，PI3-K 也是 Ras 信号转导途径的一部分。源于跨膜受体的信号可以将接头蛋白（如 Shc、Grb2 或 Gab1）募集到活化的 RTK，再通过活化 Ras 及其他一些小 GTPase（如 Rho、Rac、Cdc42 等）来活化 PI3-K。在这种情况下，PI3-K 是作为 Ras 蛋白的效应分子发挥作用的。

3）被 Gβγ 二聚体激活。有丝分裂原、IL-8 及氧化型低密度脂蛋白等激活 G 蛋白偶联受体（GPCR），所释放的 Gβγ 二聚体能够直接激活 β 和 γ 亚型 PI3-K（图 28-22）。多种胞外信号能够通过这条途径经由 G 蛋白偶联受体和 G 蛋白传递至 PI3-K 及其效应分子。

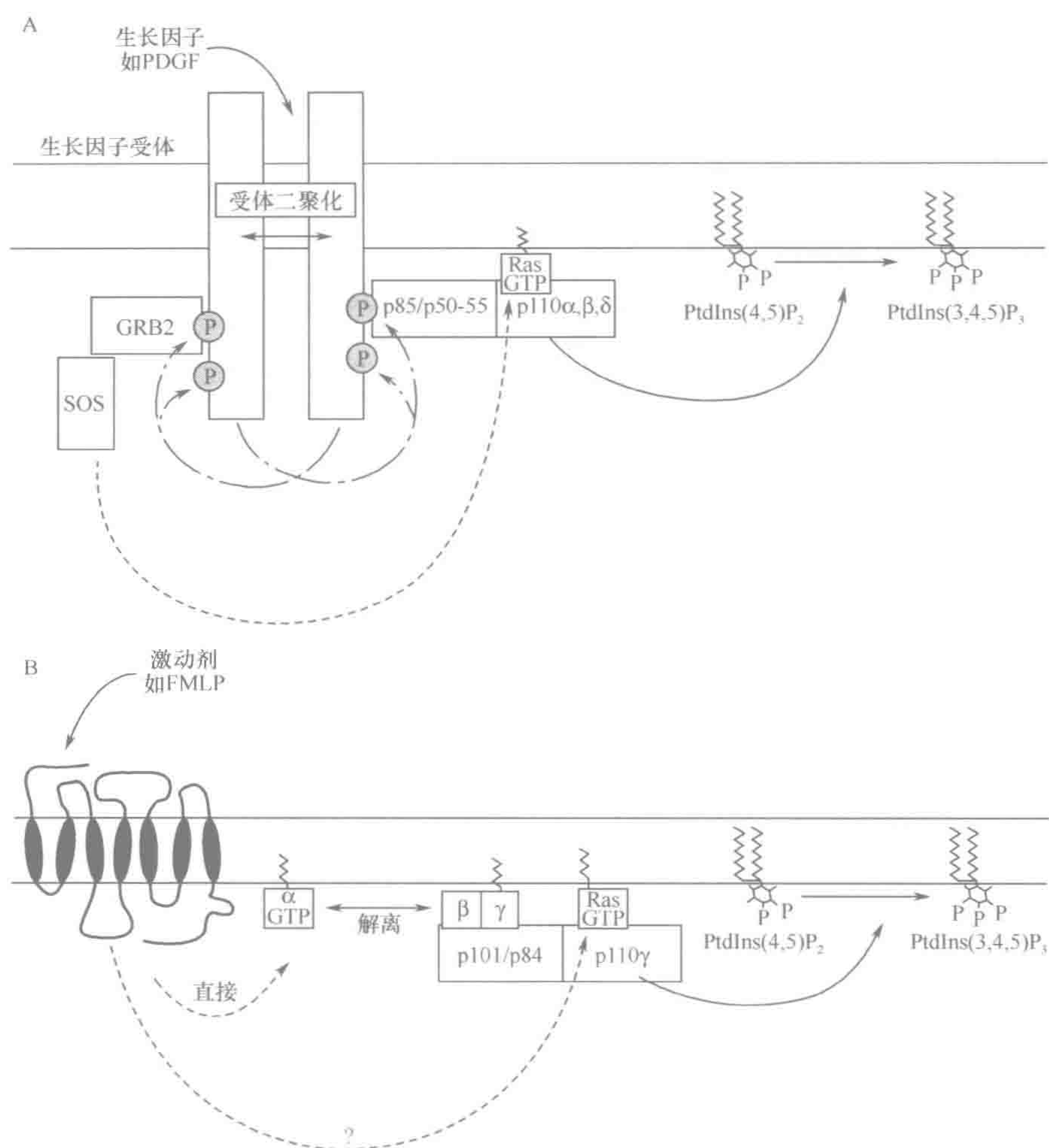


图 28-22　Ⅰ类 PI3-K 的激活途径

A. 活化的受体酪氨酸激酶激活Ⅰ类 PI3-K；B. Gβγ 二聚体激活Ⅰ类 PI3-K

4）一些非受体酪氨酸激酶如 Src、Lck、Lyn、Fyn、Jak、Fak 和 Ilk 等的活化，可通过其富含 Pro 区与 PI3-K p85 亚基的 SH3 结构域发生相互作用，募集 p85/

p110 至细胞膜内侧而活化。

（二）信使物质 PtdIns(3,4,5)P_3

在 PI3-K 催化的反应产物中 PtdIns(3,4,5)P_3 分布在细胞膜上，是一种重要的胞内信使物质，能够激活信号传递下游效应分子的功能。其功能主要是通过与信号蛋白的 pleckstrin 同源结构域（PH 结构域）的结合完成的。PH 结构域存在于多种信号蛋白结构内，可以介导蛋白质-脂类、蛋白质-蛋白质之间的相互作用。由 PI3-K 催化合成的 PtdIns(3,4,5)P_3 能够将含有 PH 结构域的蛋白质分子聚集于细胞膜上，同时引起效应蛋白的变构激活，使之发挥信号转导的功能。此外，PtdIns(3,4,5)P_3 也可与信号蛋白的其他蛋白组件如 SH2 结构域、PTB 结构域、PKC 的 C2 结构域以及某些膜蛋白含有的 FYVE 环指结构域（ring finger domain）发生特异性结合。

（三）Akt 激酶和 PtdIns(3,4,5)P_3 信号途径

Akt 也称蛋白激酶 B（PKB），是一种丝氨酸/苏氨酸特异蛋白激酶，它是最早发现的 PtdIns(3,4,5)P_3 靶蛋白。在图 28-23 中 Akt 激酶信号途径显示了 PI3-K 和 PtdIns(3,4,5)P_3 在生长因子调控的信号中的中心作用，它们将信号由细胞膜传递进入细胞质和细胞核中。

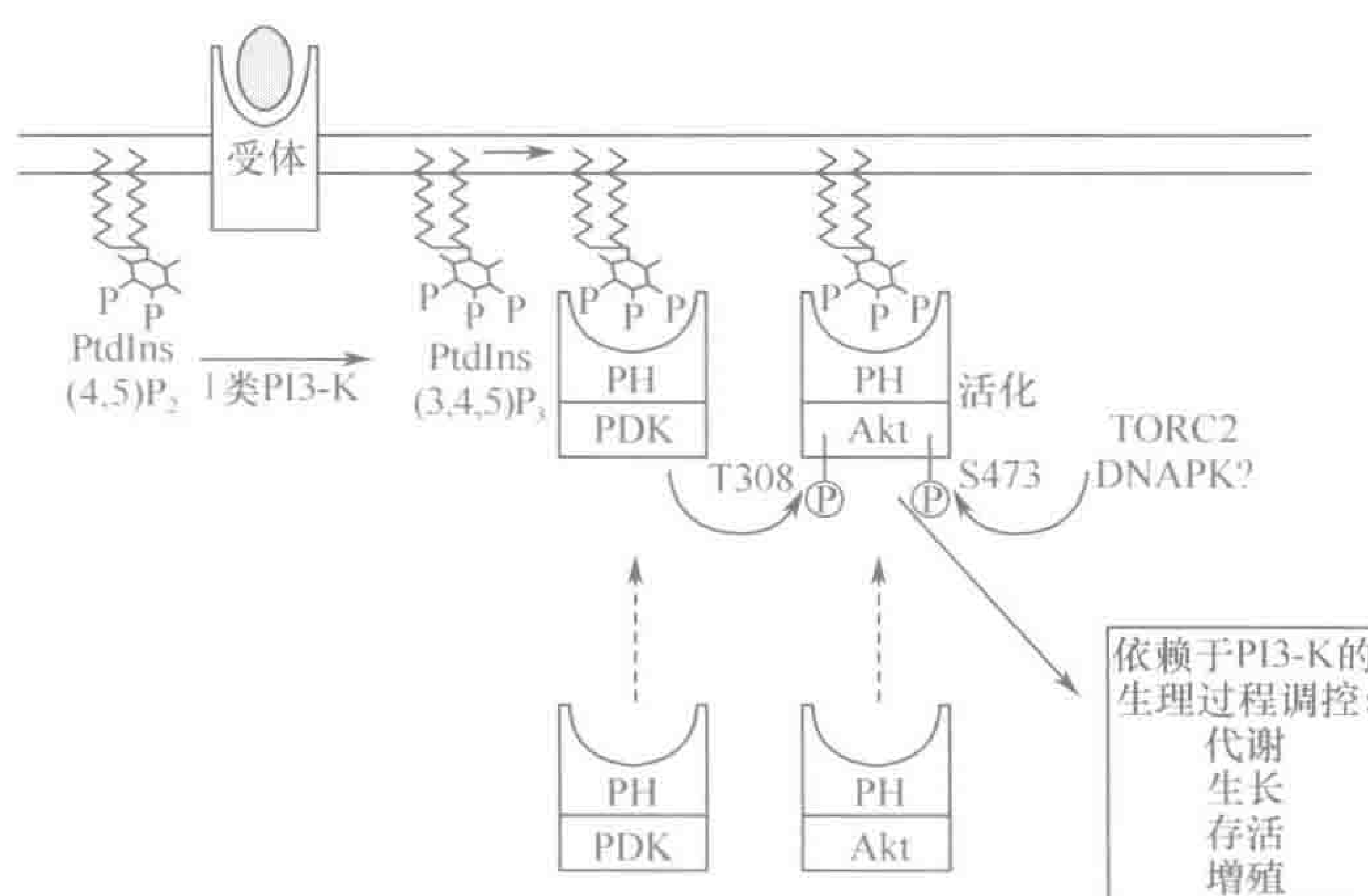


图 28-23　PI3-K 依赖的 Akt 活化

生长因子刺激产生的 PtdIns(3,4,5)P_3 可结合磷脂酰肌醇依赖型蛋白激酶 1（PDK1）和 Akt 的 PH 结构域，解除了 PDK1 和 Akt 的自身抑制作用，使 PDK1 和 Akt 活化。PDK1 对 Akt 的磷酸化作用使之完全活化。活化的 Akt 可以磷酸化多种靶蛋白，这些靶蛋白具有抑制凋亡、调节转录及其他代谢过程的作用

在 PI3-K-Akt 信号途径中，PI3-K 催化合成的 PtdIns(3,4,5)P_3 与 Akt 激酶的 PH 结构域结合，从而将 Akt 激酶聚集于细胞膜上。这个步骤是后续 Akt 激酶活化环的苏氨酸残基及氨基末端丝氨酸残基被 PDK1 磷酸化的先决条件。PDK1 也含有一个 PH 结构域，与 PtdIns(3,4,5)P_3 具有高亲和力。膜定位和双位点磷酸化导致 Akt 激酶活化，使其能够磷酸化下游底物，如 Bad 蛋白、pro-caspase9、转录因子 CREB、糖原合成酶（GSK）以及 6-磷酸果糖-2-激酶等。

借由上述途径，Akt 激酶可以调节细胞的重要代谢过程（图 28-24）。如 PI3-K/Akt 信号途径被胰岛素激活后，可以介导胰岛素的多种代谢效应，包括葡萄糖转运、脂代谢、糖原合成以及蛋白质合成。通过对凋亡相关蛋白的磷酸化，Akt 激酶对程序性细胞死亡（凋亡）具有抑制效应。此外，Akt 激酶对细胞分裂具有促进效应，已经被确认为经典的病毒癌基因。

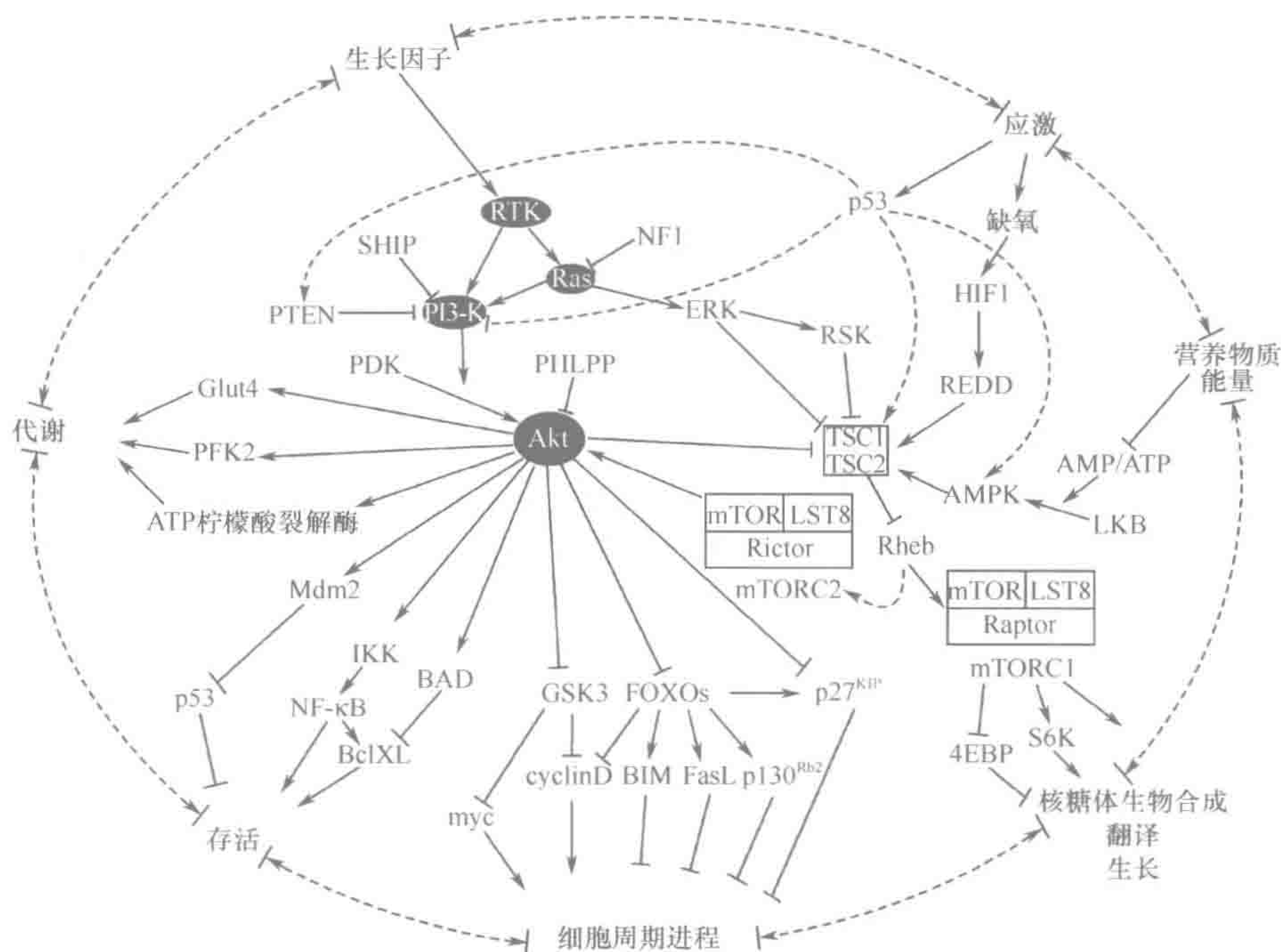


图 28-24　Akt 在细胞生长、存活和增殖中的中心地位

PTEN 具有脂类磷酸酶的活性，能够特异水解 PtdIns(3,4,5)P_3，因此可以通过降低 PtdIns(3,4,5)P_3 的浓度以及中和对 Akt 激酶的刺激来实现对 Akt 激酶信号的负调节。由于 Akt 激酶信号途径有很强的促细胞增殖和抗凋亡活性，降低 PtdIns(3,4,5)P_3 的浓度将具有抗增殖和促凋亡效应，能够抑制肿瘤的形成，因此 PTEN 磷酸酶具有肿瘤抑制活性。在多种肿瘤中都相应观察到 PTEN 磷酸酶的功能性失活，由此反映出 PtdIns(3,4,5)P_3 的代谢对生长调节的极度重要性。

第二节　信号转导与调控研究技术

信号转导与调控研究技术涉及多方面，很多是蛋白质研究的常规技术。本节中与其他章节重复的方法不再冗述，请参见其他章节相关内容，如用于检测蛋白表达量的 SDS-PAGE（第二十一章）和蛋白质印迹（第二十二章），用于研究信号蛋白之间相互作用的免疫沉淀和共沉淀（第二十三章）、GST pull-down（第二十三章）和荧光共振能量转移（FRET，参见第二十九章）等。

一、抗磷酸化氨基酸的蛋白质印迹检测

抗体对研究信号转导具有不可估量的价值。抗体可用于分析不同信号分子的大小、丰度、分布、更新、修饰和与其他蛋白质的相互作用及功能特性。常见的信号蛋白及其磷酸化形式的抗体均已商品化，如从 New England Biolabs、Upstate 公司购买。本部分以磷酸化 ERK1/2 的蛋白质印迹（Western 印迹）检测为例，简单介绍利用蛋白质印迹方法对特异性磷酸化酪氨酸进行检测。具体的蛋白质印迹实验原理和方法参见第二十二章。

材料与试剂

一抗：Phospho-p44/42 MAPK（ERK1/2）(Thr202/Tyr204)(E10) Mouse mAb (Cell Signaling Technology)

二抗：HRP 偶联的抗鼠 IgG 抗体（Cell Signaling Technology）

PBS

LoVo 人结肠腺癌细胞

MEK1 抑制剂 U0126（Calbiochem）

1×裂解液，冰冷，配自 10×细胞裂解液（Cell Signaling Technology）

BCA 蛋白定量试剂盒（Pierce）

6×SDS 上样缓冲液

封闭液

含有 Tween 20 的 Tris 平衡盐（TBST）

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate（Pierce）

振荡孵育装置

微型蛋白电泳和转膜装置（Bio-Rad）

化学发光成像仪（UVP）

0.2μm 孔径的硝酸纤维素膜（Schleicher&Schuell）

步骤

1）在 6 孔板中以 U0126（终浓度 20μmol/L）处理 LoVo 细胞，用总体积≤0.5ml 的 1×裂解液裂解细胞，置于冰上裂解 20min。

2）将细胞裂解物转移至另一个离心管，4℃高速离心 15min。

3）取上清，利用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，取 50μg 总蛋白，加 6×SDS 上样缓冲液至 1×，95～110℃加热 5min。

4）制备 SDS-聚丙烯酰胺分离胶（10%）和浓缩胶（4%）。上样，180V 电泳 70min。

5）如第二十二章所述，通过蛋白质印迹将蛋白转移至 0.2μm 孔径的硝酸纤维素膜，100V 电压转膜 1h。

6）剪除硝酸纤维素膜上不需要的部分。放入封闭液中室温 1h（或 4℃过夜）。封闭及后续的洗膜过程均在脱色摇床上振荡进行。

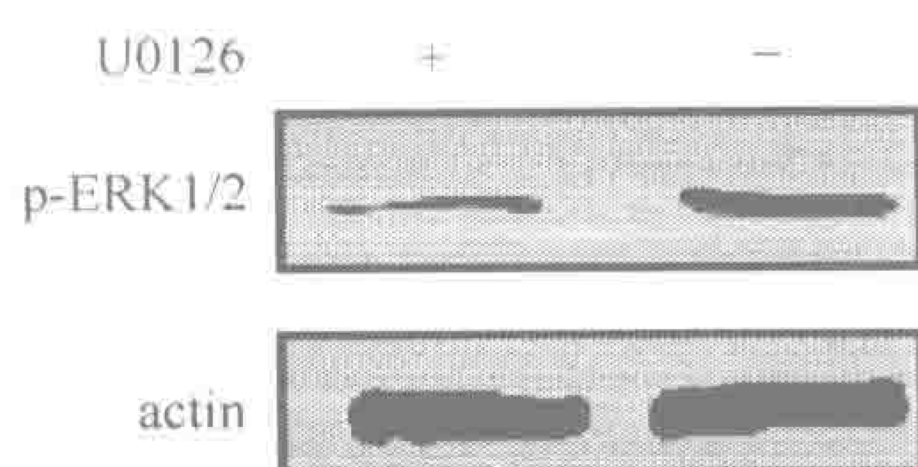


图 28-25　蛋白质印迹检测 U0126 处理后磷酸化 ERK1/2 水平的变化

7）弃去封闭液，加入 1∶1000 稀释于 TBST 中的 E10 单抗。4℃孵育过夜，或在脱色摇床上室温孵育 1h。弃去抗体溶液，以 50ml 的 TBST 室温洗 3 次，每次 15min。

8）加入 HRP 偶联的抗鼠 Ig 二抗，室温孵育 1h，如步骤 7）以 TBST 洗 3 次。

9）利用 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate 显色，并于化学发光成像仪成像。结果如图 28-25 所示。

二、蛋白激酶和蛋白磷酸酶活性的检测

本部分分别介绍了酪氨酸蛋白激酶、丝苏氨酸蛋白激酶、酪氨酸磷酸酶和丝苏氨酸磷酸酶活性的检测。其中包括放射性同位素方法和化学发光方法。

（一）MEK1 激酶活性测定

原理

本部分介绍利用放射性同位素方法测定 MEK1 激酶活性。

$$\text{未活化 MAP 激酶 2} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{活化的 MEK1，}Mg^{2+}\text{，30℃，30min}} \text{活化的 MAP 激酶 2} + \text{ADP}$$

$$\text{MBP} + [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\ \text{ATP} \xrightarrow{\text{活化的 MAP 激酶 2，}Mg^{2+}\text{，30℃，10min}} [^{32}\text{P}]\text{-MBP} + \text{ADP}$$

材料与试剂

活化的兔源 MEK1 重组蛋白（Upstate），或含有活化的 MEK1 的细胞/组织抽提物，−70℃保存

未活化的 MAP 激酶 2/Erk2 重组蛋白（Upstate），−70℃保存

Myelin Basic Protein（MBP）底物（Upstate），−70℃保存

反应稀释液 I（ADBI）（Upstate）：20mmol/L MOPS，pH7.2，25mmol/L β-甘油磷酸，5mmol/L EGTA，1mmol/L 正钒酸钠，1mmol/L 二硫苏糖醇，−20℃保存

镁离子/ATP 混合液（Upstate）：5mmol/L $MgCl_2$，500μmol/L ATP 溶于 ADBI，−20℃保存

P81 磷酸纤维素膜（Upstate）：2cm×2cm

丙酮

磷酸

振荡混匀装置

铅玻璃防护屏

振荡孵育装置

闪烁瓶，闪烁液，液闪仪

[γ-^{32}P] ATP，约 3000Ci/mmol（Amersham-Pharmacia），分装为 10μl/管－20°C 保存，使用前用 90μl 镁离子/ATP 混合液稀释。

步骤

第一部分：MAP 激酶的活化

1）按照顺序每个反应配制如下体系：

20μl 冰冷的 ADBI

10μl 镁离子/ATP 混合液

5μl（5～50ng）活化的兔源 MEK1，免疫沉淀来源的 MEK1，或含有活化的 MEK1 的细胞/组织抽提物

4μl（1μg）未活化的 MAP 激酶 2/Erk 2

2）在振荡孵育装置中 30°C 孵育 30min。

3）反应结束后加 4μl 该混合物到第二部分的反应体系中。

第二部分：MAP 激酶活性检测

1）按照顺序每个反应配制如下体系：10μl ADBI、10μl（20μg）MBP 母液、10μl 稀释的 [γ-^{32}P] ATP，短暂离心将反应体系收集到管底部。

2）在振荡孵育装置中 30℃孵育 10min。

3）将 25μl 反应混合物点到一个 p81 膜的中心。

4）用 0.75%磷酸溶液洗 3 次，每次 5min。

5）用丙酮洗一次，5min。

6）将 p81 膜放进闪烁瓶，加 5ml 闪烁液。

7）利用液体闪烁计数仪计数。从读数中减去阴性对照样品（不含激酶）的读数即为试剂读数。结果如图 28-26 所示。

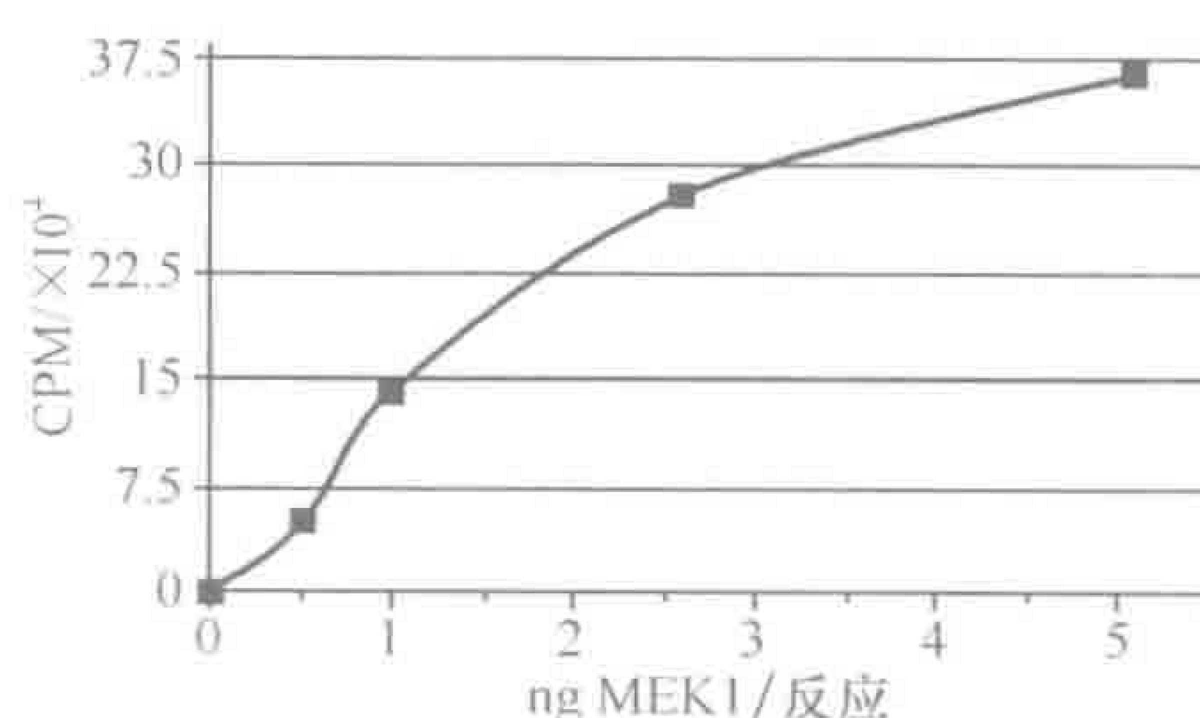


图 28-26　MEK1 激酶活性测定结果

（二）Raf-1 激酶活性测定

原理

本部分介绍利用化学发光方法测定 Raf-1 激酶活性。

$$\text{未活化 MEK1}+\text{ATP}\xrightarrow{\text{活化的 Raf-1,30℃,30min}}\text{活化的 MEK1}+\text{ADP}$$

材料与试剂

活化的人源 c-Raf-1 重组蛋白（Upstate），或含有活化的 MEK1 的细胞/组织抽提物，－70℃保存

未活化的人源 MEK1 重组蛋白（Upstate），－70℃保存

反应稀释液 I（ADBI）（Upstate）：20mmol/L MOPS，pH7.2，25mmol/L β-甘油磷酸，5mmol/L EGTA，1mmol/L 正钒酸钠，1mmol/L DTT，－20℃保存

镁离子/ATP 混合液（Upstate）：5mmol/L $MgCl_2$，500μmol/L ATP 溶于 ADBI，

-20℃保存

蛋白A纯化的兔抗人源 phospho-MEK1（Ser218/222）/MEK2（Ser222/226）抗体（Upstate），1μg/μl，-20℃保存

HRP偶联的羊抗兔 IgG（Upstate），-20℃保存

6×SDS非变性上样缓冲液

封闭液

含有 Tween20 的 Tris 平衡盐（TBST）

SuperSignal West Femto 化学发光底物（Pierce）

微型蛋白电泳和转膜装置（Bio-Rad）

化学发光成像仪（UVP）

0.2μm 孔径的硝酸纤维素膜（Schleicher&Schuell）

振荡混匀装置

振荡孵育装置

步骤

1）按照顺序每个反应配制如下体系：20μl 镁离子/ATP 混合液、1.0μl（0.1μg）活化的 Raf-1 或含有活化的 Raf-1 的细胞/组织抽提物、0.84μl（1μg）未活化 MEK1、冰冷的 ADBI 至总体积 40μl，短暂离心将反应体系收集到管底部。

2）在振荡孵育装置中 30℃ 孵育 30min。

3）反应结束后加 6×SDS 非变性上样缓冲液至 1×，煮沸 5min。

4）制备 SDS 聚丙烯酰胺分离胶（10%）和浓缩胶（4%）。上样，180V 电泳 70min。

5）如第二十二章所述，通过蛋白质印迹将蛋白转移至 0.2μm 孔径的硝酸纤维素膜，100V 电压转膜 1h。

6）用水洗 2 次，5min。

7）剪除硝酸纤维素膜上不需要的部分。放入封闭液中室温 30min。封闭及后续的洗膜过程均在脱色摇床上振荡进行。

8）弃去封闭液，加入 1μg/ml 稀释于 TBST 中的抗 phospho-MEK1（Ser218/222）/MEK2（Ser222/226）抗体。4℃孵育过夜，或在脱色摇床上室温孵育 4h。弃去抗体溶液，以水室温洗 3 次，每次 15min。

9）加入 1∶5000 稀释于 TBST 的 HRP 偶联的抗兔 Ig 二抗，室温孵育 1.5h，如步骤 8）水洗 2 次。

10）以 TBST 室温洗 3～5min。

11）将膜浸在水中，期间换 4 或 5 次水。

12）利用 SuperSignal West Femto 化学发光底物显色，并于化学发光成像仪成像。结果如图 28-27 所示。

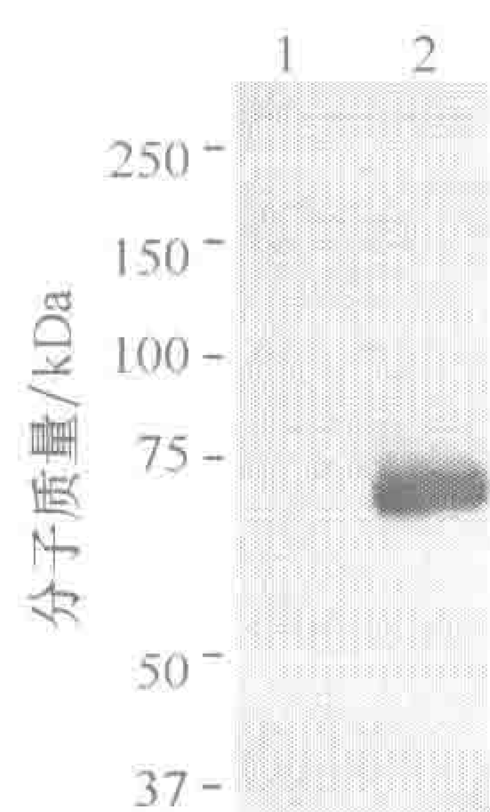


图 28-27　Raf-1 激酶活性测定结果

（三）CaMKⅡ激酶活性测定

原理

CaMKⅡ（Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ）是一种多功能的丝/苏氨酸蛋白激酶。在钙离子和钙调素存在的情况下，286位苏氨酸发生自身磷酸化，CaMKⅡ被激活，其后续活性可不依赖钙离子和钙调素存在。本部分介绍利用放射性同位素方法测定CaMKⅡ激酶活性。

材料与试剂

大鼠来源的CaMKⅡ重组蛋白（New England Biolabs）（500 000U/ml），或含有活化的MEK1的细胞/组织抽提物，−70℃保存

10×CaMKⅡ反应缓冲液［500mmol/L Tris-HCl（在25℃ pH7.5），100mmol/L $MgCl_2$，20mmol/L DTT，1mmol/L Na_2EDTA］

10×$CaCl_2$（20mmol/L）

10×钙调素（calmodulin）（12μmol/L）

100×ATP（10mmol/L）

Autocamtide-2底物（Calbiochem）（KKALRRQETVDAL），使用前溶于1×CaMKⅡ反应缓冲液，100μmol/L ATP中

P81磷酸纤维素膜（Upstate）

10% TCA（三氯乙酸）

铅玻璃防护屏

多头细胞收集器

液闪仪

[γ-^{32}P] ATP（Amersham-pharmacia）（370MBq/ml，10mCi/ml）

步骤

1）CaMKⅡ自身磷酸化：配制如下反应体系，总体积25μl：

10×钙调素 2.5μl

100×ATP 0.25μl

10×$CaCl_2$ 2.5μl

10×CaMKⅡ 反应缓冲液 2.5μl

1500U CaMKⅡ重组蛋白

置30℃孵育10min。

2）底物磷酸化：向上述混合液中分别加入Autocamtide-2至终浓度50μmol/L，及[γ-^{32}P] ATP至终浓度为100μCi/ml，置30℃孵育45min。

3）加入25μl的10% TCA（三氯乙酸），微离心5min，用多头细胞收集器将上清吸附于P81磷酸纤维素膜，干燥，于液闪仪上检测cpm值。

注意事项

该方法也可检测CaMKⅡ免疫沉淀物中CaMKⅡ的酶活性，反应体系为1×ATP，

1×CaMKⅡ 反应缓冲液，50μmol/L Autocamtide-2，100μCi/ml [γ-^{32}P] ATP，CaMKⅡ免疫沉淀物，总体积 25μl。反应条件相同。

（四）蛋白丝/苏氨酸磷酸酶活性检测

原理

蛋白丝/苏氨酸磷酸酶主要分两种：Ⅰ型（蛋白磷酸酶Ⅰ，PP1）和Ⅱ型（蛋白磷酸酶 2A、2B 和 2C）。蛋白激酶活性可方便地利用 [γ-^{32}P] ATP 掺入来定量检测，与此相比，蛋白磷酸酶活性检测要困难得多。本部分介绍利用放射性同位素方法测定蛋白丝/苏氨酸磷酸酶活性。分两步：①底物（MBP）在 PKA 作用下发生丝/苏氨酸磷酸化；②蛋白丝/苏氨酸磷酸酶对磷酸化底物的去磷酸化。

材料与试剂

蛋白丝/苏氨酸磷酸酶检测试剂盒（New England Biolabs），其中包括：PKA（1 250 000U/ml）/MyBP（18.5mg/ml）混合物、10mmol/L ATP、10×PKA 缓冲液、底物溶解缓冲液、10% Brij 35（质量体积比）、10×蛋白磷酸酶缓冲液、0.1mg/ml 蛋白磷酸酶 1（PP1）、10×$MnCl_2$（10mmol/L）

P81 磷酸纤维素膜（Upstate）

100%和 20% TCA（三氯乙酸）

Spectra/Por 1 透析袋，M_r 6000～8000（Spectrum）

透析缓冲液（25mmol/L Tris-HCl，pH7.5，0.1mmol/L Na_2EDTA，2mmol/L DTT，0.01% Brij 35）

铅玻璃防护屏

多头细胞收集器

液闪仪

[γ-^{32}P] ATP（Amersham-Parmacia）（370MBq/ml，10mCi/ml）

步骤

第一部分：MBP 底物的磷酸化

1）在一个 1.5ml 离心管中制备如下反应体系（200μl）：PKA/MyBP 混合物 40μl、10×PKA 缓冲液 20μl、ATP（10mmol/L）20μl、[γ-^{32}P] ATP 5μl（最后加入）、水 115μl。

2）置 30℃孵育过夜。

3）取 2μl 用水 1∶100 稀释，用液体闪烁计数仪对 2 份 10μl 样品进行计数，按照如下公式计算 ATP 特异活性：ATP 特异活性(cpm/pmol)＝10μl 样品的 cpm 值×(1/10)×100×200×(1/200 000)。

4）加入 1/9 体积的 100%TCA，置冰上 30min，4℃下 12 000g 离心 10min，吸弃上清。用 20%TCA 洗 3 次，每次洗涤后 4℃下 12 000r/min 离心 10min，吸弃上清。

5）加入 0.5ml 底物溶解缓冲液，以手指轻弹管底使蛋白沉淀溶解（需 5～15min）。

将底物溶液从离心管转移到透析袋中，再用 0.5ml 底物溶解缓冲液洗涤离心管，再转移到透析袋中。

6）在 1L 透析缓冲液中 4℃透析 16h 以去除残留的 ATP，中途换一次液。

7）计数 2 份 5μl 样品的放射活性。计算掺入的磷酸浓度（μmol/L）：磷酸浓度（μmol/L）=［5μl 样品的 cpm 值/特异活性（步骤 3）］×（1/5）×10^6×10^{-6}。

8）将标记的 MBP 用 1×蛋白磷酸酶缓冲液稀释至掺入的^{32}P 为 30μmol/L（5×浓度）。用此方法制备的标记底物可使用至 2 个^{32}P 的半衰期。

9）磷酸化的 MBP 置 4℃保存。

第二部分：蛋白丝/苏氨酸磷酸酶活性检测

1）在开始实验之前用 1×蛋白磷酸酶缓冲液稀释蛋白磷酸酶样品（纯化的重组蛋白或组织/细胞抽提物）。

2）在一个 1.5ml 离心管（置于冰上）中加入：蛋白磷酸酶缓冲液 30μl、稀释的蛋白磷酸酶 10μl、置 30°C 孵育 2～5min。同时要做：①空白对照反应，将以缓冲液代替蛋白磷酸酶。理论上，空白对照的 cpm 值应该小于实验组的 2%。②阳性对照反应，用不同浓度的 PP1 代替待测的蛋白磷酸酶样品（结果见图 28-28）。

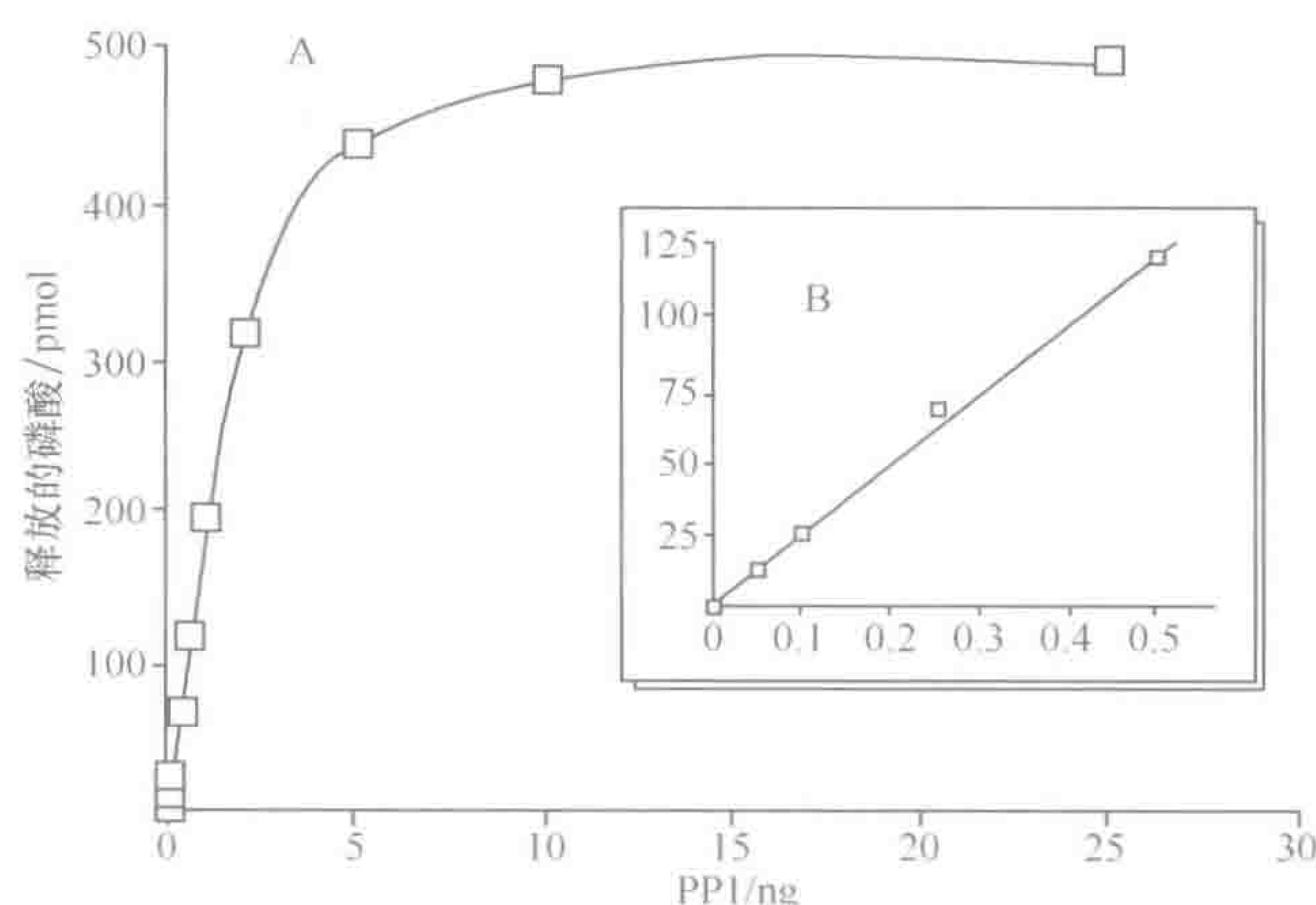


图 28-28 PP1 的蛋白丝苏氨酸激酶活性测定

A. 不同浓度 PP1 的蛋白丝苏氨酸激酶活性；B. PP1 去磷酸化的线性范围

3）加入 10μl 第一部分获得的底物溶液，置 30℃孵育 10min。

4）加入 200μl 20% TCA 终止反应，振荡混匀并置于冰上 5～10min。

5）12 000g 离心 5min。

6）在这一步中蛋白沉淀并不明显。非常小心地吸出 200μl TCA 上清，不要触及管壁。将吸出的 TCA 上清置于 2ml 水溶性闪烁液中并计数放射活性。

7）计数 10μl 的底物以计算反应中的总放射活性。在一个标准反应（50μl）中 1U 的蛋白磷酸酶活性每分钟可从 MBP（掺入磷酸浓度 10μmol/L）释放 1nmol 的磷酸。因此 10min 的反应计算如下：释放的 cpm＝样品 cpm－空白对照 cpm；活性（U/ml）＝（释放的 cpm/总 com－空白对照 cpm）×（0.5/10）×20×（250/200）

(五) 蛋白酪氨酸磷酸酶活性测定

原理

放射性同位素方法检测蛋白磷酸酶活性有明显的缺陷：底物预先磷酸化费时费力；由于放射性同位素的衰减，必须每次实验之前临时制备；多次制备的磷酸化底物之间很难达到活性的一致。本部分介绍显色方法，使用的是化学合成的底物多肽，END（pY）INASL 和 DADE（pY）LIPQQG，可以作为多种蛋白酪氨酸磷酸酶的底物。反应体系最终产生的游离磷酸可简单地用钼酸盐-孔雀石绿-磷酸复合物的吸收值来确定。

材料与试剂

蛋白酪氨酸磷酸酶检测试剂盒（Promega），其中包括：钼酸盐染料溶液、钼酸盐染料添加剂、磷酸标准品（1mmol/L KH_2PO_4）、Tyr 磷酸肽-1、END（pY）INASL（1mmol/L）、Tyr 磷酸肽-2、DADE（pY）LIPQQG（1mmol/L）（或组蛋白、casein 或其他磷酸酶天然底物）、离心柱、收集管、接头、Sephadex G-25 树脂、无磷酸的水

Sephadex G-25 贮存液：10mmol/L Tris-HCl（pH7.5），1mmol/L EDTA，0.02% 叠氮钠

步骤

第一部分：组织/细胞来源的磷酸酶样品的制备

由于组织细胞中存在高浓度的游离磷酸，对磷酸酶测定有严重干扰；此外，组织细胞中存在的高浓度 ATP 会增加背景，并且导致发生其他激酶引起底物磷酸化。因此实验前必须去除这些成分。

1）每 1g 组织加 3ml 贮存缓冲液，置冰上匀浆 30s。

2）4℃下 100 000g 离心 1h，以去除颗粒物质。

3）离心柱加 10ml 去离子水进行清洗。

4）用宽口吸头反复吹吸使 Sephadex G-25 树脂重悬。不要使用磁力搅拌装置。

5）将 10ml 重悬的 Sephadex G-25 树脂加入离心柱。

6）加 10ml 冰冷的磷酸酶贮存缓冲液到离心柱中。

7）待缓冲液流干后，4℃下 600g 离心 5min。将离心柱放置在一个新的 50ml 离心管中。

8）加 250μl 组织/细胞裂解液，4℃下 600g 离心 5min。也可以用更大的体积，但会降低去除内源性磷酸的效率。

9）收集流出液体即为样品，其中含 4%～10%的内源性磷酸，足够进行后续实验而不产生明显背景。如需进一步去除内源性磷酸，则将流出液体再过一个新的离心柱。

10）离心柱使用后可用 25ml 无磷酸的水洗涤后用贮存液平衡，并保存在 4℃。

第二部分：磷酸酶活性检测

1）实验开始之前制备染料/添加剂混合物（比例为每 1ml 钼酸盐染料溶液加入 10μl 钼酸盐染料添加剂）。此混合物不稳定，因此需现用现配，不能保存。

2）用 1mmol/L 磷酸标准品和无磷酸的水制备一系列浓度的磷酸标准品，用于绘制标准曲线。首先稀释至 50μmol/L 浓度，随后制备 50μl 1×反应缓冲液中包含 0、100pmol、200pmol、500pmol、1000pmol 和 2000pmol 游离磷酸的标准品。
3）在 96 孔板的空中直接制备除酶以外的反应体系（总体积 50μl）：100μmol/L Tyr 磷酸肽和 1×反应缓冲液。不要产生气泡。
4）将 96 孔板置于 30℃孵育 3min。
5）每个反应孔加入含酶样品（1～35μl），30℃孵育 10min。同时制备一个不含酶和不含底物的阴性对照，以及包含酶和底物但在反应起始即终止（0 时间）的对照。
6）加 50μl 染料/添加剂混合物以终止反应。同时加 50μl 染料/添加剂混合物到含磷酸标准品的一系列孔中。
7）将 96 孔板置于室温孵育 15min。如反应体系中存在 5μg 以上的蛋白，应室温孵育 30min，因为高浓度的蛋白质可延迟显色。显色一旦完成，可保持 2h。
8）在酶标仪上以 630nm 或 600nm 波长测定吸光度。630nm 的信号和背景都稍强。注意孔中的气泡和板底的水珠都会降低吸光度数值。

三、凝胶电泳迁移率变动分析技术

凝胶迁移或电泳迁移率实验（EMSA）是一种研究 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用的技术，可用于定性和定量分析。目前也已用于研究 RNA 结合蛋白和特定的 RNA 序列的相互作用。本部分以检测 HeLa 细胞核提取物中 SP1 结合活性为例，详述 EMSA 的主要过程。

原理

在非变性聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳中，DNA-蛋白复合体较游离的 DNA 或蛋白质分子的移动速率缓慢，从而能够区分 DNA-蛋白复合物与单纯 DNA 或蛋白质，用于鉴定 DNA 结合蛋白与其特异 DNA 的结合。

通常将纯化的蛋白、细胞粗提液和 ^{32}P 同位素标记的 DNA 或 RNA 探针一同孵育，在非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳上，分离复合物和非结合的探针。DNA-复合物或 RNA-复合物比非结合的探针移动得慢。同位素标记的探针依研究的结合蛋白的不同，可以是双链或者单链。当检测如转录调控因子一类的 DNA 结合蛋白，可用纯化蛋白、部分纯化蛋白或核细胞抽提液。在检测 RNA 结合蛋白时，依据目的 RNA 结合蛋白的位置，可用纯化或部分纯化的蛋白质，也可用核或胞质细胞抽提液。竞争实验中采用含蛋白结合序列的 DNA 或 RNA 片段和寡核苷酸片段（特异性竞争），和其他非相关的片段（非特异性竞争），来确定 DNA 或 RNA 结合蛋白的特异性。在竞争的特异性和非特异性片段的存在下，依据复合物的特点和强度来确定特异结合。

材料与试剂

凝胶迁移检测系统（Promega），其中包含：HeLa 细胞核抽提物（－70℃保存），T4 多核苷酸激酶（PNK），T4 多核苷酸激酶 10×缓冲液，凝胶迁移结合 5×缓

冲液，SP1 Consensus 寡核苷酸（1.75pmol/μl），AP2 Consensus 寡核苷酸（1.75pmol/μl）

[γ-^{32}P] ATP（3000Ci/mmol，10mCi/ml）（Amersham-Parmacia）

0.5mol/L EDTA

TE 缓冲液

G-25 离心柱

0.5mol/L Na_2HPO_4（pH6.8）

Whatman DE81 2.3 圆形滤膜

4%非变性聚丙烯酰胺凝胶，0.75mm 厚

无核酸酶的水（Promega）

10×凝胶上样缓冲液：250mmol/L Tris-HCl（pH7.5），0.2%溴酚蓝，40%甘油

10×TBE 缓冲液

干胶仪

闪烁液

闪烁瓶

液体闪烁计数仪

X 线片和增感屏

步骤

1）磷酸化反应：在一个无菌的 1.5ml 离心管中配置如下反应体系：

Consensus 寡核苷酸（1.75pmol/μl）	2μl
T4 多核苷酸激酶 10×缓冲液	1μl
[γ-^{32}P] ATP（3000Ci/mmol，10mCi/ml）	1μl
无核酸酶的水	5μl
T4 多核苷酸激酶（5～10U/μl）	1μl
总体积	10μl

2）置 37℃孵育 10min。

3）加入 1μl 0.5mol/L EDTA 以终止反应。

4）加入 89μl TE。

5）可选：按照以下方法计算掺入百分率。

（1）取 4 份 1μl 样品，分别点在 4 张 Whatman DE81 2.3 圆形滤膜中心。干燥。

（2）取两张滤膜用于直接计数样品中总 cpm 值；另外两张用 50ml 0.5mol/L Na_2HPO_4（pH6.8）洗 2 次，每次 5min，以去除未掺入的 ATP。干燥。

（3）将滤膜分别放入闪烁瓶，加入闪烁液，在液体闪烁计数仪上计数放射活性。

（4）按照一下公式计算掺入百分率：掺入百分率＝(掺入的 cpm 值/总 cpm 值)×100%。用上述方法，掺入百分率一般大于 50%。如低于 30%，则 EMSA 检测信号会很弱。理论上，放射标记的寡核苷酸的特异活性为（5000～20 000cpm)/(10～100fmol)。

6）（可选）去除标记寡核苷酸样品中未掺入核苷酸：可将样品过 G25 离心柱（经

TE 平衡），去除未掺入核苷酸。

7）制备 4%非变性聚丙烯酰胺凝胶（0.75mm 厚）。注意所有玻璃板只用蒸馏水洗涤，不能存在去污剂（如 SDS）。

8）在 4 个无菌离心管中分别按顺序配制如下反应体系。

#1（阴性对照）：

无核酸酶的水	7μl
凝胶迁移结合 5×缓冲液	2μl
HeLa 细胞核抽提物	0μl
总体积	9μl

#2（阳性对照）：

无核酸酶的水	7μl
凝胶迁移结合 5×缓冲液	2μl
HeLa 细胞核抽提物	2μl
总体积	9μl

#3（特异性竞争对照）：

无核酸酶的水	4μl
凝胶迁移结合 5×缓冲液	2μl
HeLa 细胞核抽提物	2μl
未标记的竞争性寡核苷酸	1μl
如 SP1Consensus 寡核苷酸	(1.75pmol)
总体积	9μl

#4（非特异性竞争对照）：

无核酸酶的水	4μl
凝胶迁移结合 5×缓冲液	2μl
HeLa 细胞核抽提物	2μl
未标记的非竞争性寡核苷酸	1μl
如 AP2Consensus 寡核苷酸	(1.75pmol)
总体积	9μl

9）室温孵育 10min 后，加 1μl ^{32}P 标记的 SP1 Consensus 寡核苷酸到每个反应管中。

10）室温孵育 20min。

11）加 1μl 保温到室温的 10×凝胶上样缓冲液，用于电泳。凝胶上样缓冲液中的染料可能会干扰某些蛋白与 DNA 的结合。在这种情况下，可以仅在阴性对照中加入。

12）上样前用 0.5×TBE 缓冲液在 350V 电压下预电泳 10min。上样后，0.5×TBE 缓冲液在室温、350V 电压下电泳至溴酚蓝泳动到胶的 3/4 处（一般在 20min 以内）。注意保持胶的温度低于 30℃。

13）电泳结束后将胶放于一张 Whatman 3MM 滤纸上，用塑料膜包裹并在干胶仪上干燥。于－70℃放射自显影 1h（用增感屏），或者用磷成像仪器进行分析。

14）各种对照的分析：①为标记的寡核苷酸将泳动至染料前沿。②如果形成特异性复合物，加入未标记的特异性竞争物后条带密度应降低。加入未标记的非特异性竞争物后条带密度不变。③如果形成非特异性复合物，加入未标记的特异性竞争物后条带密度变现，加入未标记的非特异性竞争物后条带密度降低。

注意事项

1）在凝胶阻滞实验的整个过程中，必须注意不能使蛋白质变性，一旦发生蛋白质变性，则会影响其与探针结合，导致实验失败。因此，从核蛋白提取、标记探针与蛋白质结合到电泳整个过程中都要防止蛋白变性。常规的上样缓冲液含有 SDS 蛋白变性剂，所以不能使用。

2）不同实验的信号强度不同，如信号较弱，放射自显影时间需要较长，蛋白质-探针复合物区带就会扩散，导致条带模糊。如果电泳结束后，首先干胶，再进行放射自显影，则条带就不会扩散了。

四、染色体免疫共沉淀技术

染色体免疫共沉淀分析（chromatin immunoprecipitation，ChIP）是目前确定与特定蛋白结合的基因组区域或确定与特定基因组区域结合蛋白质的最好方法，它是将结合在 DNA 上的蛋白质与 DNA 进行交联，可以把动态的生物化学过程凝固下来，与 EMSA（体外分析转录调控蛋白和相应核苷酸序列的结合）相比较，能更为真实、完整地体现结合在 DNA 序列上的调控蛋白与 DNA 的相互作用。本部分以检测 STAT3 与 SOCS-3 相应启动子的结合为例进行详细说明。

原理

ChIP 的目的是了解染色体（质）及其相结合的蛋白质之间的时空动态和相互作用。可用于研究基因启动区域每个碱基的重要性，或研究某个转录因子与靶基因相互作用。

ChIP 先通过甲醛作用使蛋白质与 DNA 发生共价连接，通过离心即可得到 DNA-蛋白复合物。随后利用复合体中目标蛋白的抗体将其免疫共沉淀，将免疫共沉淀得到的复合物解交联，沉淀并纯化复合物中的 DNA，然后用该 DNA 作为探针进行 Southern 印迹检测潜在的结合位点，或作为模板进行 PCR 扩增特定的结合序列。

材料与试剂

Chip 检测试剂盒（Upstate），其中包含：蛋白 A 琼脂糖珠/鲑鱼精 DNA，SDS 裂解缓冲液，ChIP 稀释缓冲液，低盐免疫复合物洗涤缓冲液，高盐免疫复合物洗涤缓冲液，LiCl 免疫复合物洗涤缓冲液，TE 缓冲液，5mol/L NaCl，1mol/L Tris-HCl（pH6.5）

抗 STAT3 抗体（Upstate）

PCR 检测 STAT3 结合 SOCS-3 相应启动子的引物：

正义链：5′-CCT CTG AGA AGA GGG GAC AA-3′

反义链：5′-ACC GCT TCC AGC AAA AGA GT-3′

37%甲醛

含有蛋白酶抑制剂［1mmol/L 苯甲基磺酰氟（PMSF），1μg/ml 抑肽酶（aprotinin）1μg/ml 胃酶抑素（pepstatin）A］的 PBS

洗脱缓冲液：1% SDS，0.1mol/L $NaHCO_3$

酚/氯仿/异戊醇=25：24：1（体积比）

95%乙醇

70%乙醇

振荡混匀装置

振荡孵育装置

细胞刮

超声破碎仪（Sonics 公司，VCX130）

步骤

1）细胞在室温下用 PBS 洗 2 次，加入甲醛至终浓度 1%，置 37℃孵育 10min。

2）尽量吸弃培养基，用冰冷的含有蛋白酶抑制剂的 PBS 洗 2 次。

3）刮下并收集细胞（4℃下 2000r/min 离心 5min），然后用冰冷的 PBS 漂洗 2 次。

4）用 200μl（对应 1×10^6 个细胞）SDS 细胞裂解液（加入蛋白酶抑制剂）重悬细胞。4℃放置 10min。

5）置冰上超声打断 DNA（长度 200～1000bp）。因为实验结果可能因使用不同的超声器而有差异，所以应该选择最佳的超声条件。以下状态是用 Sonics VC130 超声仪和 3mm 探头为例：超声强度在 5～6，持续状态 30s×4 次。

6）提取物在 4℃下 12 000g 离心 15min。将上清（染色质）转移到一个 2ml 离心管中，弃去沉淀。

7）使用 ChIP 稀释缓冲液稀释 10 倍（200μl+1800μl），补加蛋白酶抑制剂。

8）取 1%即 20μl 的稀释液作为对照（input）。

9）为降低非特异性背景，加入 50μl Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose（50%混悬液）4℃下振荡孵育 30min 以预先清洁染色质溶液。4℃下 2000r/min 离心 5min。收上清。

10）上清中加入一抗，置 4℃孵育过夜。同时制备一个无抗体的阴性对照。

11）加入 50μl 蛋白 A 琼脂糖珠/鲑鱼精 DNA（50%混悬液）并置于 4℃孵育 2h。

12）4℃下 1000r/min 离心 1min，收集珠子并置于冰上，利用下述缓冲液振荡漂洗珠子 5min：①用 1ml 低盐缓冲液洗 3 次；②用 1ml 高盐缓冲液洗 1 次；③用 1ml LiCl 缓冲液洗 1 次；④用 TE 缓冲液洗 2 次。经过这一步骤，样品已经是蛋白 A-抗体-histone-DNA 复合物，可以进行后续的免疫沉淀、蛋白质印迹或 PCR 扩增。

13）加入 500μl 洗脱液洗脱珠子。将试管置于 65℃水浴 1h，期间混匀数次。

14）5000r/min 离心 3min 移去珠子。保留上清。

15）加入 20μl 的 5mol/L NaCl，65℃水浴 4h［步骤 8）的 input 也一同进行水浴］，

以解除交联。

16）分离 DNA：用 500μl 酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1）提取上清一次，充分混匀。14 000r/min 离心 10min 使两相分离。保留水溶相。

17）乙醇沉淀 DNA。TE 缓冲液溶解 DNA。

18）以提取的 DNA 为模板，进行 PCR，检测 STAT 3 与 SOCS-3 相应启动子的结合。

注意事项

1）不是每一种抗体都适用于 ChIP 实验。不同的抗体和抗原结合能力不同，有的抗体可以结合抗原但未必能用在 ChIP 反应。现在生产抗体的公司对产品的用途都进行标注，随着 ChIP 的广泛应用，有的厂家对抗体能否用于 ChIP 也进行了标注，因此在购买及使用前一定仔细阅读抗体的说明书，若厂家没有标注，则需要查找文献或通过预实验来确定抗体的使用。

2）剪切过程一定要低温及加蛋白酶抑制剂。ChIP 是基于免疫学原理的免疫共沉淀，因此对于可能造成影响抗原决定簇，进而影响与抗体结合的因素应加以控制。为防止蛋白质的水解、修饰，溶解抗原的缓冲液必须加蛋白酶抑制剂；利用超声对 DNA 进行剪切会产生热量，为防止蛋白质热变性，需要在冰上操作。

五、信号蛋白的泛素化分析技术

泛素是一个由 76 个氨基酸组成的高度保守的多肽链，因其广泛分布于各类细胞而得名。它通过 C 端的甘氨酸残基与靶蛋白赖氨酸侧链的 ε-氨基形成的异肽键共价结合。此外，泛素尚可通过内在的赖氨酸残基被自身修饰形成多聚泛素链。一般情况下，多聚泛素链可以导致靶蛋白被蛋白酶水解。此外，最近的研究表明，泛素在与底物蛋白结合后可以产生非蛋白酶体作用，特别是在胞内一些蛋白质的内含体转运过程中，泛素可能起到了枢纽作用。

（一）免疫沉淀方法

原理

泛素与蛋白质共价结合后可以使蛋白质的分子质量增加 8kDa，故在 SDS-PAGE 分析时，其迁移速率会下降。用一种可识别泛素化形式的目的蛋白抗体进行蛋白质印迹，在没经过泛素化修饰的目的蛋白条带上方约 8kDa 处为泛素化形式的目的蛋白质。由于一般信号蛋白在泛素化状态下只占总蛋白质中很小的一部分，所以通常用的抗体在检测泛素化蛋白时通常不够敏感。因此，为提高检测灵敏度，可通过免疫沉淀方法富集受体蛋白，然后再用抗泛素抗体进行蛋白质印迹来检测泛素化的信号蛋白。下面以检测 SOCS-1 对接头蛋白 MAL 的泛素化为例介绍这些检测方法。这些方法稍加修改就可用于检测其他信号蛋白和受体的泛素化。

材料与试剂

HEK-293 人胚肾细胞

抗HA 抗体（Cell Signaling Technology），抗 Falg M2 单克隆抗体（Stratagene），

辣根过氧化物酶（HRP）偶联的第二抗体（Cell Signaling Technology）

带有 Flag 标签的 Mal 表达载体（Flag-Mal），带有 Myc 标签的 SOCS-1 表达载体（Myc-SOCS-1），带有 HA 标签的泛素表达载体（HA-ubiquitin）

GeneJuice 转染试剂（Novagen）

裂解缓冲液：50mmol/L Tris-HCl（pH7.4），1.0% Triton X-100，150mmol/L NaCl，1mmol/L EDTA，2mmol/L 正钒酸钠，10mmol/L NaF，1mmol/L PMSF，并加入蛋白酶抑制剂混合液（Roche）

清洗缓冲液：同裂解缓冲液

乙基苯丙胺（*N*-ethylamleimide，NEM）每次均在临用前加入裂解液中，终浓度为 20nmol/L

7%SDS-PAGE 凝胶

封闭液

TBST

PBS

蛋白酶抑制剂：每次都应新鲜配制加入，1μg/ml 抑肽酶，10μg/ml 亮肽酶素，0.2mg/ml苯甲脒，1μg/ml 胃酶抑素 A（以上均为终浓度）

5×样品缓冲液

SuperSignal West Femto 超敏化学发光底物（Pierce）

蛋白 A-琼脂糖珠（Roche），抗 Falg M2 琼脂糖珠（Sigma）

细胞刮

台式冷冻离心机

化学发光成像仪（UVP）

步骤

1）转染前 1 天，2×10^{6} 个 HEK-293 细胞铺板，用含 10% FBS 的 DMEM 培养。

2）根据供应商的操作指南，用转染试剂对细胞进行瞬时转染，800ng Flag-Mal、100ng HA-ubiquitin 及 100ng Myc-SOCS-1 表达载体。

3）48h 后，将待测细胞的培养皿置于冰上，以 2ml 预冷 PBS 冲洗一次。

4）加入 1ml 裂解缓冲液裂解细胞，刮下培养皿内细胞，转移到微量离心管。在冰上孵育 10min 以保证细胞完全溶解。

5）4℃下 9000*g* 离心 10min 以沉淀细胞碎片。

6）将 500μl 上清小心转移到新的离心管中，加入 50μl 蛋白 A-琼脂糖珠，4℃孵育 30min，以预净化（preclear）细胞裂解液。

7）加入 50μl 抗 Falg M2 琼脂糖珠，4℃振荡孵育 2h，以沉淀 Mal。

8）12 000r/min 离心 5s，收集 MAL-抗体-蛋白 A-琼脂糖珠复合物。

9）小心去除上清，用 750μl 裂解液重悬沉淀，4℃振荡孵育 10min。

10）重复步骤 9）～10）共 3 次。

11）按步骤 9）收集复合物，小心去除残留的裂解液。

12）加入 30μl 5×SDS 凝胶上样缓冲液，洗脱琼脂糖珠上的蛋白质，室温孵

育 10min。

13）进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质，依照标准 Western 印迹方法将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。

14）以抗 HA 抗体（1∶1000）检测泛素化的 Mal，以抗 Flag 检测 Mal 总量。

注意事项

1）也可使用商品化的抗泛素化单克隆抗体（如 Abcam 或 Zymed）来检测泛素化蛋白，但使用抗标签抗体可提高检测的敏感性。

2）7%的凝胶有助于分离泛素化的蛋白质。

3）不能使用煮沸的方法从小珠上洗脱蛋白质，因为煮沸可能导致某些蛋白质聚集，从而阻碍它们在 SDS-PAGE 中的迁移。

（二）亲和基质方法

原理

通过可与泛素化蛋白高结合力的亲和基质，从细胞提取液、组织裂解液以及体外分析中分离单体泛素化和多体泛素化的蛋白（不依赖赖氨酸残基连接成链）。捕获的蛋白质可以使用偶联泛素特异性抗体进行 Western 印迹分析，也可以使用目的蛋白特异性抗体检测目的蛋白，或者从基质上洗脱后用于后继的生物化学特征鉴定（图 28-29，见书后彩图）。

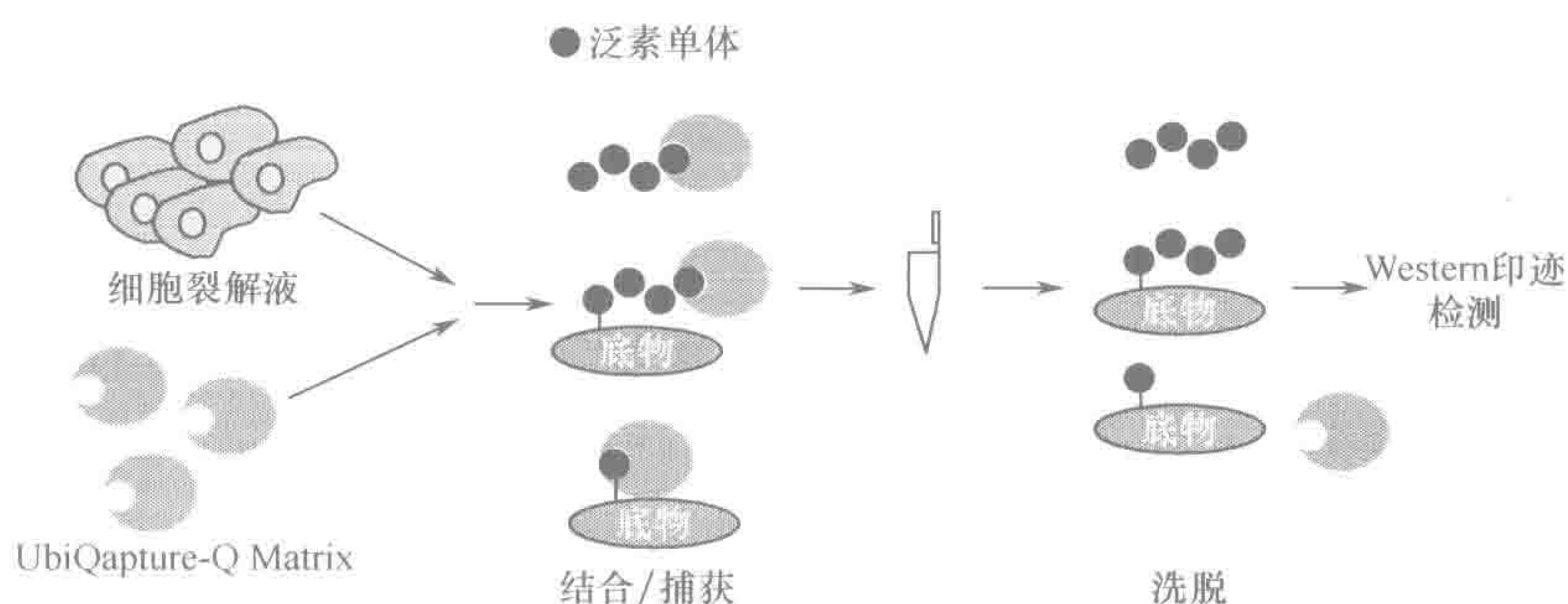


图 28-29　亲和基质方法分离泛素化蛋白

材料与试剂

UbiQapture-Q 泛素化蛋白分离富集试剂盒（Enzo），其中包含：UbiQapture-Q 基质，50%混悬液，4℃保存；对照泛素化蛋白裂解液（5mg/ml），－70℃保存；偶联泛素特异性 HRP 标记抗体（用于 Western 印迹 1∶500～1∶1000 稀释），－70℃保存；0.5ml 螺口管

5×SDS 上样缓冲液

PBS

10%聚丙烯酰胺凝胶或 4%～15%线性梯度胶（如 Rio-Rad）

预染蛋白分子质量标准（如 Invitrogen）

PVDF 膜（如 Millipore）

（可选）目的蛋白特异性抗体及合适的 HRP 标记二抗

Western 印迹检测试剂（如 Pierce）

PBS-T 溶液：含 0.2% Tween 20 的 1×PBS

BSA/PBS-T 阻断液：含 1%BSA 的 PBS-T 溶液

步骤

1）临用前从 -70℃ 冰箱中取出分装为 5～10μl 小份的对照泛素化蛋白裂解液，使其在 4℃融化。随后的步骤均在冰上进行。

2）在一个 0.5ml 螺口管中加 5μl 对照泛素化蛋白裂解液和 95μl 冰冷的 PBS，配置成对照结合溶液，含 25μg 总蛋白（浓度为 250μg/ml）。

3）在其他的管中配制样品结合溶液，蛋白量同样为 25μg，蛋白浓度为 250μg/ml，体积为 100μl。每份样品可预留同样的量作为“起始物质”以进行泛素化蛋白捕获前后的比较。预留的样品加 5×SDS 上样缓冲液，于 95℃煮沸 10min。并保存于 -20℃直至后续使用。

4）取出 UbiQapture-Q 基质轻轻翻转，使之重悬。

5）用一个宽口吸头吸取 40μl 样品到一个新管中，加 200μl PBS，轻轻翻转混匀，5000*g* 离心 10s，小心移去液体，注意不要触及基质沉淀。UbiQapture-Q 基质的离心转数不能超过 5000*g*，否则会造成树脂的破坏。

6）把步骤 2）、3）制备的对照/样品结合溶液（100μl）加到每个管中，轻轻翻转混匀。

7）将管子置于一个水平混合装置上，4℃混匀至少 2h，使泛素化蛋白偶联到亲和基质上。一般 4h 即足够捕获大部分泛素化蛋白，但有些反应需要孵育过夜。

8）配制洗液：样品结合溶液用 9 倍体积 PBS 加 1 倍体积的样品裂解液，对照结合溶液直接用 PBS。

9）将对照/样品于 5000*g* 离心 15～30s 以收集 UbiQapture-Q 基质。

10）小心吸去上清，注意不要触及基质沉淀。上清保存于新管作为“未结合部分”（约 100μl），加入 5×SDS 上样缓冲液，于 95℃煮沸 10min。并保存于 -20℃直至后续使用。

11）基质沉淀用 200μl 洗液漂洗，轻轻翻转混匀。

12）于 5000*g* 离心 30s 以收集 UbiQapture-Q 基质。

13）如前述小心吸去上清，注意不要触及基质沉淀。如果有必要，上清可保存于新管作为“漂洗部分”。

14）重复步骤 11）～13），再漂洗一次。

15）基质沉淀加入 80μl PBS 和 25μl 5×SDS 上样缓冲液以洗脱泛素-蛋白质偶联物。此时总体积约 125μl，其中含 20μl 基质。

16）将管子置于一个水平混合装置上，4℃混匀 15min，随后于 95℃煮沸 10min，作为“洗脱部分”。如果有必要，洗脱部分可离心分离上清和沉淀。至此洗脱部分可直接进行 Western 印迹分析，或者保存于 -20℃直至后续使用。

17）将洗脱部分进行 SDS-PAGE 分离蛋白。如果有必要，可将同等体积的“起始

物质”、“未结合部分”、“漂洗部分”和“洗脱部分”一同进行 Western 印迹分析。

18）常规 Western 转膜至 PVDF 膜上。

19）用 BSA-PBS-T 室温阻断 1h 或 4℃阻断过夜。

20）室温用 PBS-T 洗 3 次，每次 10min。

21a）加入偶联泛素特异性 HRP 标记抗体（1∶500～1∶1000 稀释于 BSA-PBS-T）室温孵育 1h 或 4℃孵育过夜。室温用 PBS-T 洗 6 次，每次 10min。

21b）加入特异性目的蛋白第一抗体（稀释于 BSA-PBS-T），室温孵育 1h 或 4℃孵育过夜。室温用 PBS-T 洗 3 次，每次 10min。加合适的二抗（稀释于 BSA-PBS-T），室温孵育 1h。室温用 PBS-T 洗 6 次，每次 10min。

22）用 Western 印迹检测试剂孵育 1min，并在化学发光系成像系统中成像和分析。

注意事项

应避免使用含有蛋白变性剂（如尿素）的样品裂解液。同时应尽量降低裂解液中的还原剂（如 DTT）和去污剂的浓度。高盐（＞500mmol/L）也会影响泛素结合。

六、荧光素酶报道基因检测

原理

报道基因是研究基因调控的有力工具，尤其是荧光素酶报道基因技术，以其简单、快速、定量等特点受到科研工作者的青睐。荧光素酶报道基因检测方法（luciferase reporter gene assay）是以荧光素（luciferin）为底物，萤火虫（*Photinus pyralis*）荧光素酶（firefly luciferase）可以催化荧光素（luciferin）氧化成氧合荧光素（oxyluciferin），在荧光素氧化的过程中，会发出生物荧光（bioluminescence）。然后通过荧光测定仪（luminometer）或液闪测定仪，就可以测定荧光素氧化过程中释放的生物荧光。通过荧光素和荧光素酶这一生物发光体系，可以极其灵敏、高效地检测基因的表达。

在用萤火虫荧光素酶定量基因表达时，通常采用第二个报道基因来减少实验中其他变化因素的影响。原理是一个报道基因活力的改变，与基因表达的特定实验条件相关，而另一个报道基因的组成性活力作为内对照值，使实验值规一化变得简单易行。但传统的共报道基因（如 CAT、β-Gal 和 GUS）因其各自的测试化学、处理要求和检测特点存在差异而显得不够便利。Promega 公司的双荧光素酶报道基因（DLR）检测系统为双报道基因检测提供了有效手段。在 DLR 检测中，萤火虫荧光素酶和海肾（*Renilla reniformis*）荧光素酶可在单个样品中连续测量。两个报道基因具有兼容的化学特性、操作条件、速度、灵敏度、线性范围和仪器需要等。测量过程是：加入荧光素酶检测试剂Ⅱ产生萤火虫荧光信号，信号持续至少 1min，这样先测量萤火虫荧光素酶报道基因。定量萤火虫荧光强度之后，再在同一样品中加入 Stop & Glo 试剂，将上述反应淬灭，并同时启动海肾荧光素酶反应，同时进行第二次测量。如果使用带有试剂自动注射器的荧光发光计，两个检测可在 4s 内完成。在 DLR 检测系统中，两个报道基因产生的线性

检测范围均在小于 10～18mol 的灵敏度范围内，两个报道基因在实验宿主细胞内均无内源活性。另外，此系统中一体化形式的双荧光素酶检测既可快速定量检测转染细胞，也可用于快速定量检测无细胞转录/翻译反应体系中的两个报道基因。本部分以 p27 报道基因检测为例详述双荧光素酶报道基因检测的方法。

材料与试剂

Dual-Luciferase Reporter Assay 试剂盒（Promega），其中包含：荧光素酶检测缓冲液Ⅱ，荧光素酶检测底物（冻干粉），Stop & Glo 缓冲液，Stop & Glo 底物（50×），被动裂解缓冲液（PLB）（5×）

PBS

含有海肾荧光素酶编码序列的 pRL-TK 载体（Promega，#E2241）

p27 的报道基因质粒 p27PF 及对照质粒 pGVB2（由 Prof. Toshiyuki Sakai，Kyoto，Prefectural University of Medicine 惠赠）

微孔板荧光测定仪（Lumat 9506 冷光检测系统，Berthold Technology 公司）

步骤

1）荧光素酶检测试剂Ⅱ（LARⅡ）的配制：使用前将荧光素酶检测底物（冻干粉）加入荧光素酶检测缓冲液Ⅱ，并彻底重悬。LARⅡ一旦配制完成，可在－20℃保存一个月，或在－70℃保存一年。

2）将 p27 报道基因质粒 p27PF 及质粒 pRL-TK 质粒共转染于 LoVo 细胞，并以 pGVB2 质粒作为阴性对照。裂解细胞，利用 DLR 法测定 p27 报道基因转录活性。

3）瞬时转染 48h 后，吸弃培养基，细胞用冷 PBS 洗 2 遍，洗去没有贴壁的细胞和残余培养基。吸净残存的 PBS。

4）加入 PLB 裂解液 100μl/孔（24 孔板），室温振荡裂解细胞 15min。

5）取上清，此时样品可采保存于－80℃直至后续使用。

6）荧光素酶活性测定前，提前 30min 打开微孔板荧光测定仪进行预热。

7）取 25μl 样品加入 25μl LAR，用加样器吹吸几次混匀后，立即测量萤火虫荧光素酶活性。

8）随后加入 25μl Stop & Glo 试剂，在灭活萤火虫荧光的同时激活海肾荧光，振荡混匀后，立即测量 pRL-TK 海肾荧光素酶活性（用以均衡不同孔之间的转染效率的差异）。

9）记录 p27 萤火虫荧光素酶活性与 pRL-TK 海肾荧光素酶活性的比值作为 p27 报道基因活性值。

注意事项

1）第 3 步 PLB 裂解液的用量，一般 500μl/孔（6 孔板）、100μl/孔（24 孔板）、20μl/孔（96 孔板）。

2）本方法中细胞的裂解采用了室温振荡裂解（被动裂解）的方式，也可采用主动裂解。方法是：①加入 PLB 裂解液后用无菌的细胞刮刮取下细胞；②再用加样

器反复吹吸进行裂解；③样品经1～2个冻融循环即可达到完全裂解；④如有必要，在台式冷冻离心机上高速离心30s，沉淀细胞碎片，再将上清转移至新管。注意如果处理多个样品，应使用一次性细胞刮或对细胞刮进行彻底清洁处理后再重复使用。

3）配制完成LARⅡ应避免反复冻融，最好能分装成小份保存，如1ml/支可供10次检测使用。LARⅡ中的成分具有高度热不稳定性，每次融化时应在室温的水浴中进行。在使用前应颠倒混匀几次或轻轻振荡混匀。

七、双分子荧光互补技术研究活细胞中信号蛋白之间的相互作用

双分子荧光互补（bimolecular fluorescence complementation，BiFC）分析技术，是一种直观、快速地判断目标蛋白在活细胞中的定位和相互作用的新技术。目前该技术已应用于转录因子、G蛋白βγ亚基的二聚体形式、不同蛋白质间产生相互作用强弱的比较以及蛋白质泛素化等方面的研究。本部分以p27和ERK2的相互作用研究为例详述BiFC方法。

原理

1. BiFC的原理

GFP及其突变体作为能够在活体中表达且易于检测的报道基因，通常是以完整的氨基酸序列作为标记物。进一步研究发现，GFP氨基酸序列中的某些特定位点与氨基端以及羧基端之间的序列循环互换后仍然能够正确折叠形成生色团结构并保持荧光特性。在GFP及其突变体氨基酸序列的155或173位点，将其分裂为均不具备发光性能的荧光蛋白片段，即氨基端片段（含第1～154或第1～172氨基酸序列）和羧基端片段（含第155～238或第173～238氨基酸序列），当某些特定的氨基端片段与羧基端片段组合作为标记分子分别与两个能够发生相互作用的蛋白质配偶体形成融合蛋白并同时在活细胞中表达时，蛋白质配偶体的结合驱使氨基端片段与羧基端片段重新组装形成荧光复合物，恢复荧光效应。这一现象即称为双分子荧光互补（BiFC），能产生BiFC效应的氨基端片段与羧基端片段称为互补片段（图28-30，见书后彩图）。

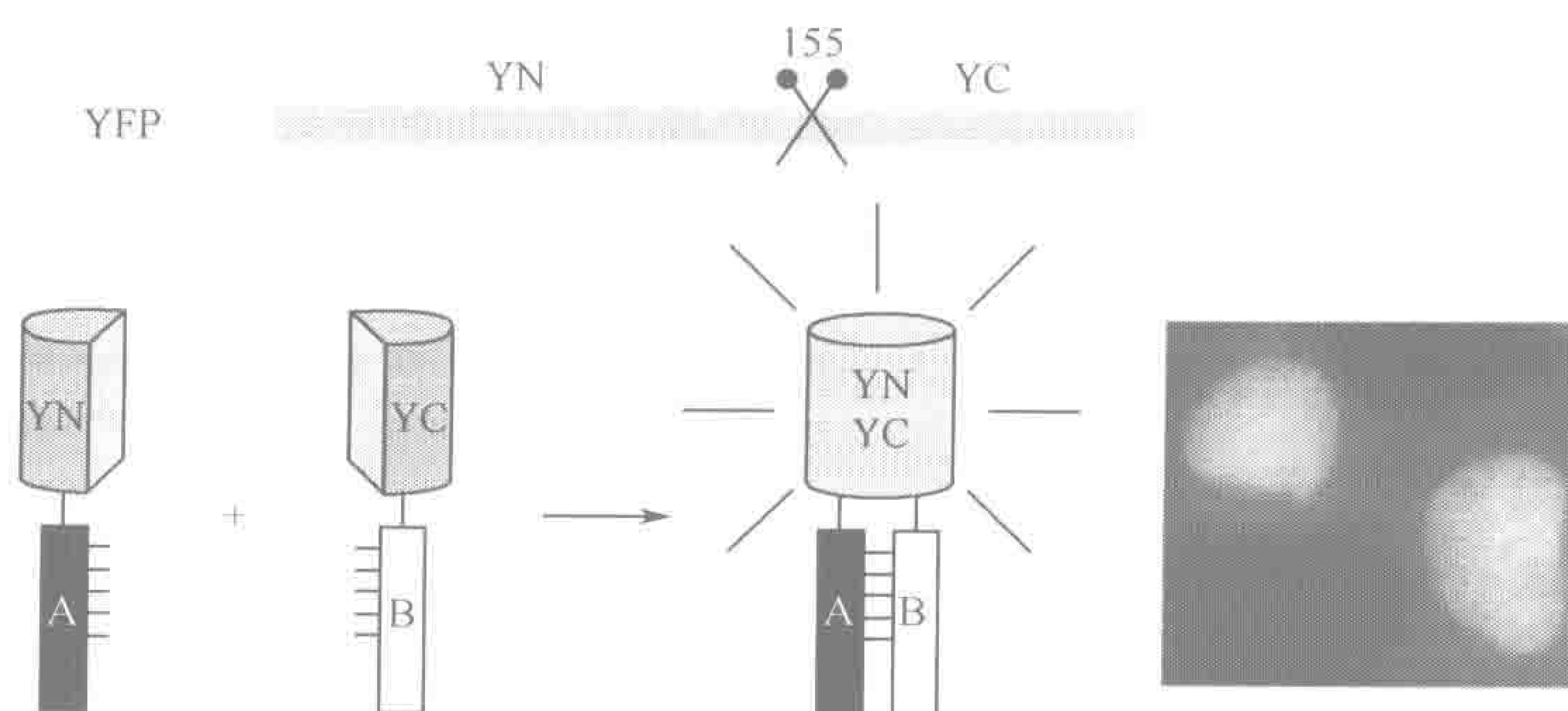


图28-30　BiFC原理

2. BiFC 的特性

按照不同的分裂位点，每个荧光蛋白可产生两个氨基端片段和两个羧基端片段，分别以 N155、N173 和 C155、C173 表示。BiFC 可发生于同一荧光蛋白的氨基端片段与羧基端片段之间，如 EYFP 的 N155 和 C155、N173 和 C173，也能发生于不同荧光蛋白的氨基端片段与羧基端片段之间，如 GFP 的 N173 和 EYFP 的 C173、EYFP 的 N173 和 ECFP 的 C155。某些荧光蛋白片段具有多重互补特性，能够与两种以上其他片段互补，如 EYFP 的 N173 能够与 EYFP 的 C173、C155 和 ECFP 的 C155 形成荧光复合物。

最早确认的 12 种互补片段组合来源于 EGFP、EYFP、ECFP，分属 7 个不同的光谱类型。这些互补片段标记的融合蛋白载体转染细胞并稳定表达后，必须在低温下（30℃）预孵化 0～24h 以促进互补片段组装形成的生色团成熟。为克服低温引起的应激刺激的影响，目前已发现几种新的性能优异的荧光蛋白互补片段，如 YFP 的两个新的突变体 Citrine 和 Venus 以及 ECFP 的改进型荧光蛋白 Cerulean，其氨基端片段与羧基端片段的所有组合均能在 37℃生理培养条件下产生荧光互补，这不仅明显缩短了反应时间，使形成的双分子荧光复合物的荧光强度提高 2 倍以上，并且需要转染的质粒数量也大大减少。在已经发现的互补片段组合中，目前认为最有效，并推荐使用的互补片段组合及其光谱特点见表 28-2。

表 28-2　推荐使用的互补荧光片段组合

互补片段	激发波长/发射波长
YN155-YC155	500/535nm
YN173-YC173	500/535nm
VN155-VC155	500/535nm
VN173-VC173	500/535nm
CN155-CC155	436/470nm

注：YN155 对应 EYFP 的 1-154 氨基酸残基，YC155 对应 EYFP 的 155-238 氨基酸残基；YN173 对应 EYFP 的 1-172 氨基酸残基，YC173 对应 EYFP 的 173-238 氨基酸残基；VN155 对应 Venus 的 1-154 氨基酸残基，VC155 对应 Venus 的 155-238 氨基酸残基；VN173 对应 Venus 的 1-172 氨基酸残基，VC173 对应 Venus 的 173-238 氨基酸残基；CN155 对应 ECFP 的 1-154 氨基酸残基，CC155 对应 ECFP 的 155-238 氨基酸残基。

多种蛋白质之间的选择性相互作用在生命领域研究中起着重要作用。BiFC 技术只能检测两两蛋白质之间的相互作用，随后发展起来的多色荧光互补技术（multicolor fluorescence complementation）弥补了它的不足。将 GFP、YFP、CFP、BFP 分别在 155 位或 173 位氨基酸处切开产生的 N 端片段和 C 端片段任意配对，进行荧光互补检测。结果不仅 YN155-YC155 中检测到荧光，YN155-CC155、YN173-YC155、YN173-CC155 中也同样能检测到荧光，并且波长各异。多色荧光互补技术不仅能够在活细胞中直接观察蛋白质相互作用的发生位置，而且直观地表现出检测蛋白质或蛋白质基团之间相互作用的强弱关系，全面直观地反映出在活细胞最接近生理条件下的蛋白质功能（图 28-31）。

3. BiFC 的特点

BiFC 有许多特点使它对蛋白质的交互作用研究极有帮助。

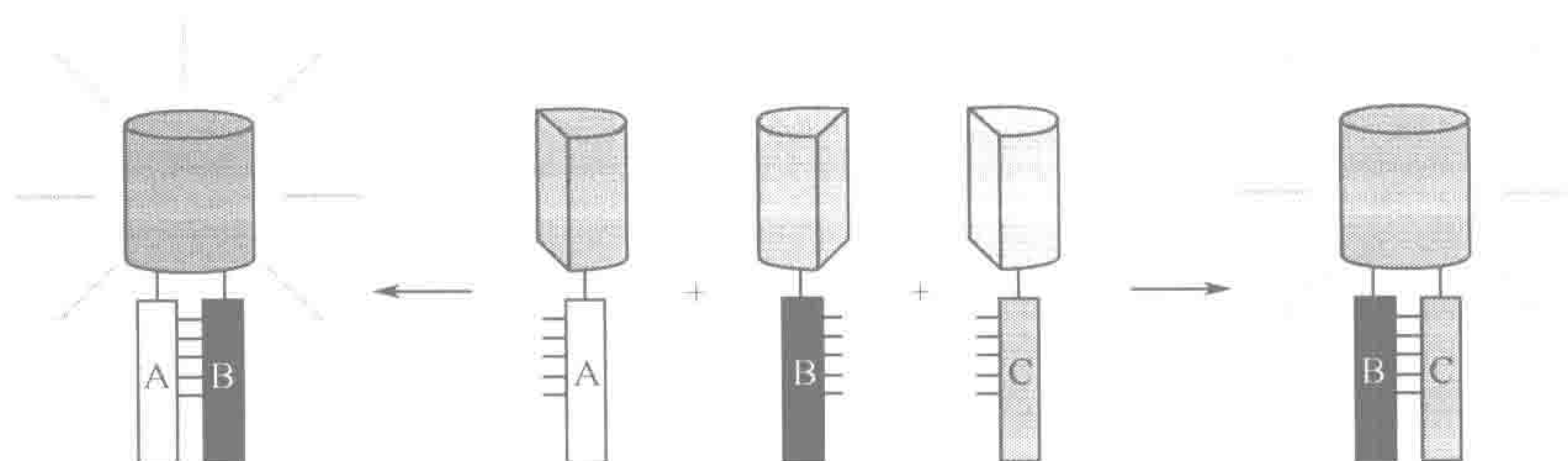


图 28-31　多色荧光互补的原理

1）BiFC 分析使蛋白质的交互作用变得可视化，直接可依据荧光的有无观测，而不需要它们的进一步的次级作用。
2）BiFC 分析可以在活细胞生理环境中直接、原位显示蛋白质相互作用产物，这样就排除了细胞裂解或固定带来的潜在影响。
3）BiFC 分析的蛋白质是表达在相对天然的环境中，而且表达量也和原来细胞水平相似，暗示它很有可能反映出细胞蛋白质的本来特性，包括一些翻译后修饰。同时 BiFC 具有的灵敏度足以检测与内源性表达水平相当的蛋白质间的相互作用。
4）双分子荧光复合物的形成不需要外加底物和辅助因子，使蛋白质相互作用的检测对细胞的干扰降低到最低程度。
5）BiFC 分析不需要生化上量的方程的计算，但能检测到两蛋白质间亚群的交互作用。
6）BiFC 分析适用于可形成二聚体或共价结合的蛋白质间的相互作用，包括肽、核内蛋白、泛素家族蛋白、信号蛋白、酶复合物、膜蛋白、核酸结合蛋白、植物蛋白、植物病原体。能鉴定新的蛋白质间的相互作用而无须了解其相互作用有关结构基础的先验知识。
7）不同的双分子荧光复合物之间的光谱差异能够满足以不同的颜色在同一细胞中同时可视化多种蛋白质间相互作用的需要。并可观察选择性的蛋白质交互作用中的竞争关系。
8）除普通荧光显微镜外，利用 BiFC 进行蛋白质相互作用分析不需要特殊仪器，观察也很简便直观，实验结果也不需要进行复杂的数据处理或荧光校正。

材料与试剂

预混合 2×PCR 反应体系，T4 连接酶，内切核酸酶（Takara）
感受态 DH5α 菌
超纯质粒中提试剂盒（Invitrogen）
氨苄青霉素（上海生工公司）
pcDNA3.1/myc-His（—）B 质粒载体（Invitrogen）
pEYFP-N1 质粒载体（BD Clontech）
人结肠癌细胞株 SW620（ATCC）

离子霉素（Sigma）

Lipofectamine2000 转染试剂（Invitrogen）

Hoechst 33258（5μg/ml，Sigma）

共聚焦荧光显微镜（LSM confocal microscope，Carl Zeiss）

步骤

1）YN-ERK 载体的构建：以 pEYFP-N1 质粒载体为模板，PCR 扩增 EYFP 的 N 端 154 的氨基酸序列 YN154；以 HEK293 细胞为模板，PCR 扩增仪 ERK2 编码序列。YN154 连同 AAANSSIDLISVPVDSR 连接子编码序列融合到 ERK2 编码序列的 N 端，并插入 pcDNA3.1/myc-His（－）B 载体，构建成融合表达 YN154-连接子-ERK2 的 YN-ERK 载体。

2）YC-p27 载体的构建：以 pEYFP-N1 质粒载体为模板，PCR 扩增 EYFP 的 C 端 155-238 氨基酸序列 YC155；以 HEK293 细胞为模板，PCR 扩增仪 p27 编码序列。YC155 连同连接子编码序列融合到 p27 编码序列的 N 端，并插入 pcDNA3.1/myc-His（－）B 载体，构建成融合表达 YC155-连接子- p27 的 YC-p27 载体。

3）铺六孔板前在孔中放入盖玻片，将 SW620 细胞铺在玻片上，铺板后 24h，单独转染或共转染 YN-ERK2 和 YC-P27 质粒。培养 36h 后，细胞用 Hoechst 33258（5μg/ml）染色，用 PBS 洗 3 遍，加入新鲜的培养基。

4）用共聚焦显微镜观察，激发光调为（500±10）nm，在（535±15）nm 处观察（结果见图 28-32，或见书后彩图）。

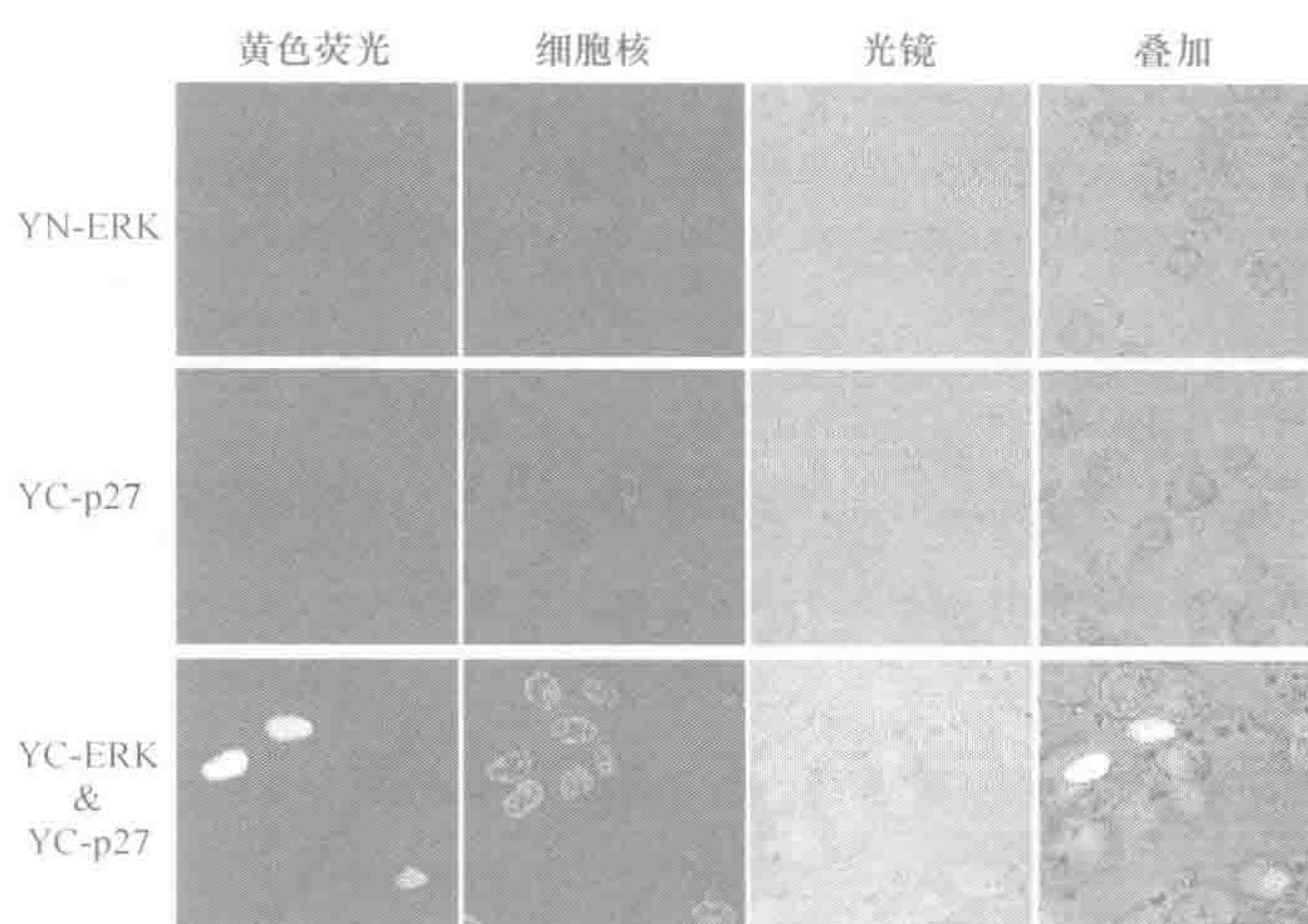


图 28-32　BiFC 检测 ERK 与 p27 的相互作用

注意事项

1）步骤 3）共转染后细胞一般在 37℃细胞培养箱中培养 12～36h 后就能在荧光显

微镜或共聚焦下进行荧光检测，而在 30℃，5%CO_2 的环境下培养，更能促进荧光生色团的形成，增强荧光号。因此可在 37℃下培养 24h 后再改用 30℃培养 4～16h，能有效提高荧光效果。

2）细胞产生的荧光强弱可以用 Automated Feature Recognition 等软件进行定量分析。但产生荧光的强弱并不能够绝对说明荧光互补产生的效率，还需要排除转染效率、蛋白质表达水平等因素的影响。因此，还有必要加入内参，即在共转染的同时，再转染一个编码全长荧光蛋白的质粒，该荧光蛋白与用来做互补检测的荧光蛋白光谱波长应该有明显差异，镜检时才不会出现相互影响。如用 YFP 做荧光互补，可选用 CFP 做内参。CFP 的荧光强度反映背景信号，用 YFP 检测波长测到的荧光强度与 CFP 检测到的荧光强度的比值，就能有效地将蛋白质复合物产生的荧光强度调整到等量蛋白质复合体的基础上，从而反映出荧光互补的产生效率。而目前一般是通过免疫共沉淀、蛋白质印迹检测来确定蛋白质表达量。

（李　楠　曹雪涛）

参考文献

Barsyte-Lovejoy D, Galanis A, Sharrocks AD. 2002. Specificity determinants in MAPK signaling to transcription factors. J Biol Chem, 277 (12): 9896～9903.

Bradshaw JM, Waksman G. 2002. Molecular recognition by SH2 domains. Adv Protein Chem, 61: 161～210.

Bromberg J, Chen X. 2001. STAT proteins: signal traducers and activators of transcription. Methods Enzymol, 333: 138～151.

Garcia KC, Teyton L, Wilson IA. 1999. Structural basis of T cell recognition. Annu Rev Immunol, 17: 369～397.

Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. 2007. G protein regulation of MAPK networks. Oncogene, 26 (22): 3122～3142.

Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. 2005. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. Trends Biochem Sci, 30 (1): 35～42.

Hoeflich KP, Ikura M. 2002. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. Cell, 108 (6): 739～742.

Itoh S, Ten DP. 2007. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. Curr Opin Cell Biol, 19 (2): 176～184.

McKay MM, Morrison DK. 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. Oncogene, 26 (22): 3113～3121.

Oancea E, Meyer T. 1998. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. Cell, 95 (3): 307～318.

Okkenhaug K, Ali K, Vanhaesebroeck B. 2007. Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110delta isoform of PI3K. Trends Immunol, 28 (2): 80～87.

Pawson T, Raina M, Nash P. 2002. Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. FEBS Lett, 513 (1): 2～10.

Stoker AW. 2005. Protein tyrosine phosphatases and signalling. J Endocrinol, 185 (1): 19～33.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. 2001. Small GTP-binding proteins. Physiol Rev, 81 (1): 153～208.

Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. Nat Rev Mol Cell Biol, 6 (8): 599～609.

第二十九章　激光扫描共聚焦显微镜技术

目前共聚焦显微镜技术在免疫学、微生物学、生理学、病理学、药理学、遗传学及神经生物学等众多学科的研究中发挥着越来越重要的作用。共聚焦显微镜按照显微镜构造原理的不同分为激光扫描共聚焦显微镜（laser scanning confocal microscope，LSCM）和数字共聚焦显微镜两种。激光扫描共聚焦显微镜是20世纪80年代逐渐发展起来的一种在传统荧光显微镜成像的基础上，集激光扫描技术、荧光探针标记技术和计算机图像处理技术于一身的新型细胞生物学分析仪器。本章主要介绍激光扫描共聚焦显微镜在免疫学研究领域中的相关应用。

第一节　激光扫描共聚焦显微镜成像原理及结构

一、激光扫描共聚焦显微镜的成像原理

在传统的光学显微镜下观察生物样品时，由于一般光学显微镜使用的是场光源，在光散射的作用下生物样品纷繁复杂的内部结构相互重叠，观察起来非常困难。同样，在荧光显微镜中观察生物样品时，在所观察的视野内，样品所有的点被同时照射和成像。荧光显微镜物镜不但收集来自焦平面的光线，而且还收集焦平面上下的光线，因此位于焦平面外的发射光也能形成一个宽视野的模糊图像，从而降低了信噪比，导致荧光标记物质结构重叠，大大影响了荧光图像的清晰度和分辨率。尤其是观察较厚样品时，这种清晰度的降低会更加显著。然而，激光扫描共聚焦显微镜的出现彻底改变了传统荧光显微镜的这一局限。激光扫描共聚焦显微镜利用光学共聚焦的原理，将激光技术、荧光显微镜技术相结合，通过采用点照明和点探测的成像方式，获得了比传统的荧光显微镜更清晰、更优质的成像效果（图29-1）。

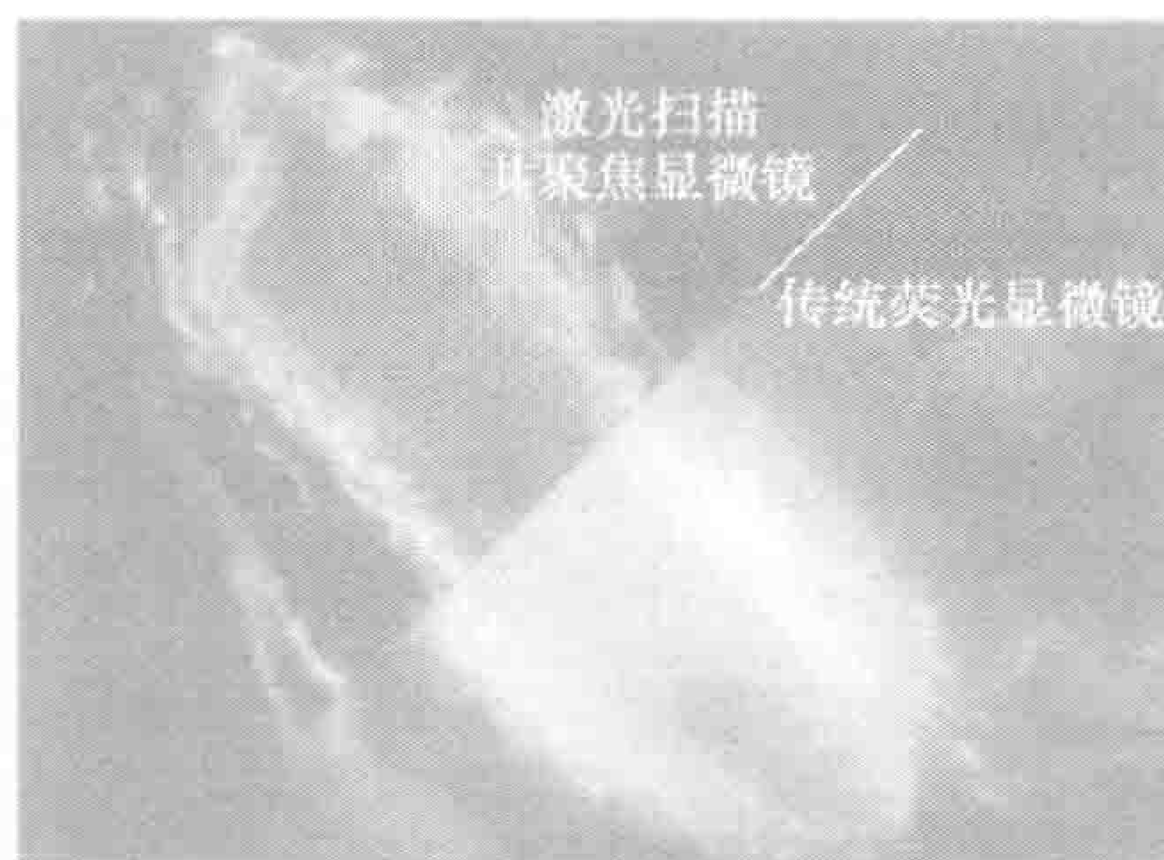


图29-1　激光扫描共聚焦显微镜和传统荧光显微镜成像对比

激光扫描共聚焦显微镜以激光作为光源，通常包含氩离子激光管、氪离子激光管和氦氖离子激光管。由激光器发射出一定波长的激发光，激光经过光源针孔形成点光源。通过分光镜反射后的激光经物镜聚焦于检测样品的焦平面上。因此，在物镜的聚焦平面上将只有一个点被光源照射。这个点被激发出来的荧光再次沿着原来的光路由物镜会聚，再通过分光镜的折射，穿过检测针孔到达光电检测器，从而将荧光信号转换为与荧光强度成正比的电信号。这种焦平面的几何共轭设计使得来自焦平面的光点恰好在进入检测针孔时会聚。因此，产生的荧光图像仅反映位于焦平面的荧光标记物的内部结构，焦平面以外或光点以外的发射光不能通过检测针孔，它有效地阻挡了同一焦平面上的非测量点的杂散荧光及非焦平面上的干扰荧光。虽然不在焦平面上的样品也会受到激光激发产生荧光，但是由于检测针孔的阻挡无法到达光电检测器，从而不能被检测到。由于激光的穿透力非常强，这种技术可以得到传统光源检测不到的样品深部的图像，非常适合观察较厚的生物样品。因此，激光扫描共聚焦显微镜中所谓的“共聚焦”就是指光源针孔和检测针孔具有共同的焦平面，这种采用了双针孔装置，形成物象共轭的独特设计就是激光扫描共聚焦显微镜的成像基础（图 29-2）。

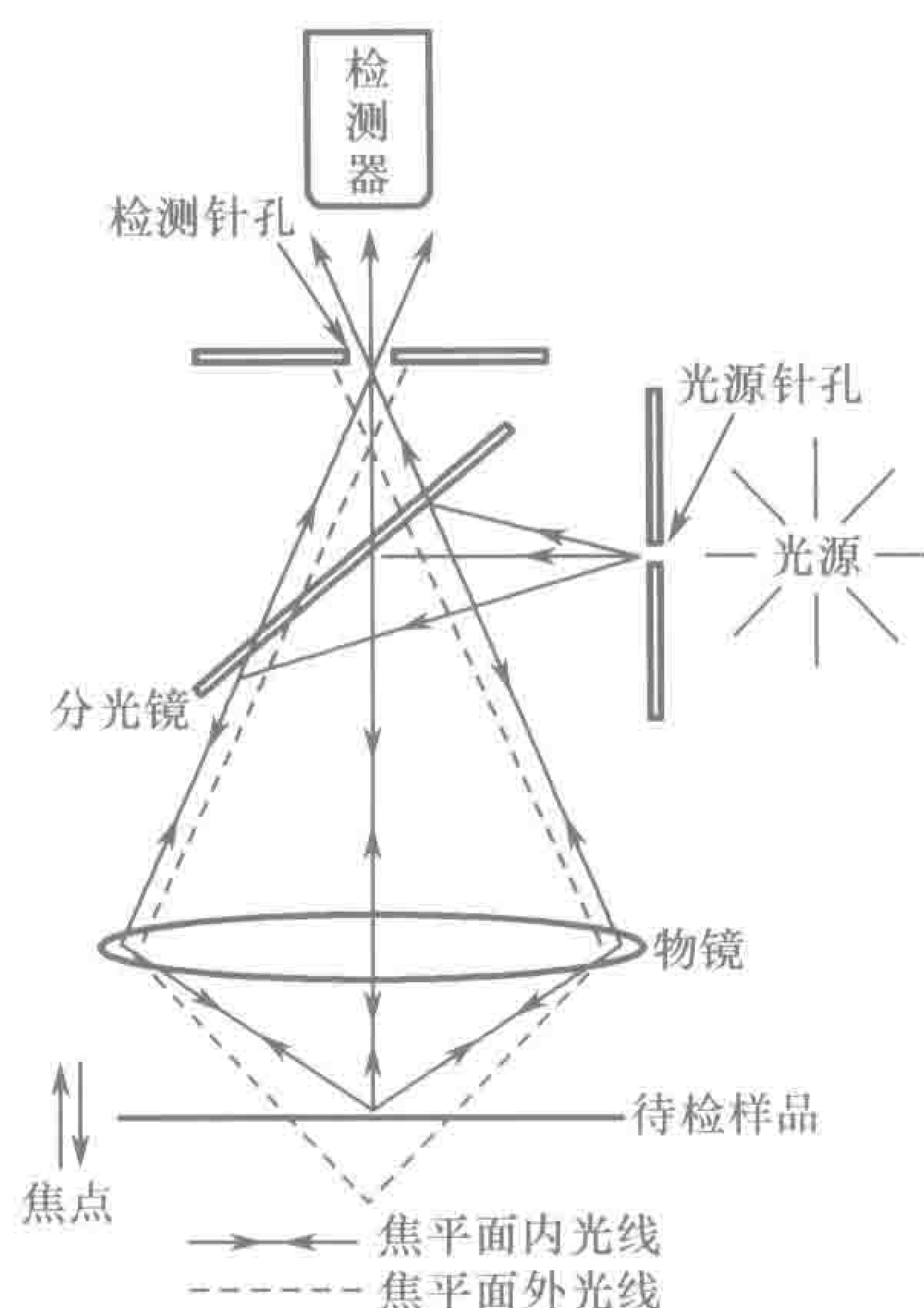


图 29-2　激光扫描共聚焦显微镜成像原理

二、激光扫描共聚焦显微镜的基本结构

激光扫描共聚焦显微镜主要由以下 5 部分组成：激光器、扫描装置、检测装置、荧光显微镜和计算机系统。各部分由共聚焦显微镜专用软件统一控制，从而确保各部分的协调运行。

（一）激光器

激光具有光单色性强、方向性好、亮度高、相干性好的特性。因此，激光是共聚焦显微镜最理想的光源。目前常用的激光扫描共聚焦显微镜的激光光源有氩离子激光管，包括 Ar-458nm、Ar-476nm、Ar-488nm、Ar-514nm；氪离子激光管，包括 Kr-568nm、Kr-647nm；氦氖离子激光管 HeNe-543nm、HeNe-633nm 和紫外激光管 UV-351nm、UV-364nm。将 4 种不同的激光管各选一个配合使用即可满足大多数荧光探针的需要。

激光器工作时会产生大量的热量，因此，为保证激光器正常工作及其寿命，一般需要在激光器旁边安装风冷系统进行散热降温，同时周围环境温度最好控制在 22℃左右。一般在开启激光器电源前 20min 应先启动房间的冷却系统，包括风机系统与空调；实验结束关闭激光器电源后 20min 待整个激光器冷却下来后再关闭房间的冷却系统。

（二）扫描装置

目前激光扫描共聚焦显微镜中广泛应用的扫描方式主要包括台阶式扫描和光束式扫描，其工作原理及相互区别见表 29-1。一般激光扫描共聚焦显微镜均同时采用上述两种扫描方式。

表 29-1　激光扫描共聚焦显微镜扫描方式

项目	台阶式扫描	光束式扫描
样品	在计算机控制下按扫描要求作 x 轴和 y 轴方向的运动	保持不动
激光束	保持不动	对样品进行逐点、逐线的移动扫描
优点	有效消除成像点像差，分辨率高	图像采集速度快，有利于活组织和细胞的离子变化等检测
缺点	图像采集速度慢，扫描时间长	光束对物镜会造成偏轴扫描，影响图像质量

（三）检测装置

检测装置是激光扫描共聚焦显微镜的一个重要的组成部分，包括分光镜、检测针孔、发射荧光分色器和检测器。首先各种激光经过分光镜的作用到达检测样品，然后样品的反射光再经过分光镜分离后进入后续相应的检测通道。检测针孔是位于检测器前面的一个小孔，它的主要作用就是排除非焦平面的反射光，针孔的大小由计算机软件调节控制。针孔越小检测到的荧光信号越清晰，但是图像的荧光强度越弱。因此，在保证图像荧光强度足够强的前提下应该尽量减小针孔的大小。发射荧光分色器的作用是选择一定波长范围的发射光进行检测。检测器的作用是将接收到的光子信号转换成电信号，经过计算机处理形成图像。目前在激光扫描共聚焦显微镜中经常使用的检测器包括光电倍增管（photo multiplier tube，PMT）和电感耦合器（charge coupled device，CCD）。光电倍增管具有很高的光信号放大作用，因此灵敏度高，有利于检测微弱的荧光信号，适用于台阶式扫描方式。电感耦合器件可以同时接受多点的光信号，有利于快速成像，适用于光束式扫描方式。一般激光扫描共聚焦显微镜均同时配备光电倍增管和电感耦合器两种检测器。

（四）荧光显微镜

一般而言，根据物镜与载物台的相对位置分为正置荧光显微镜和倒置荧光显微镜两种荧光显微镜。物镜在载物台的上方称为正置荧光显微镜，物镜在载物台的下方称为倒置荧光显微镜。目前激光扫描共聚焦显微镜大多数采用倒置荧光显微镜，因为倒置荧光显微镜可以直接将培养板或培养皿放在载物台上观察，尤其适用于高倍镜下对样品的动态观察。荧光显微镜通常配备卤素灯光源和高压汞灯光源两种光源，前者用于寻找样品的焦平面，后者用于扫描前观察和预览样品中产生的荧光。

（五）计算机系统

计算机系统是激光扫描共聚焦显微镜的指挥总部，各种扫描方式的选择、PMT 检

测器增益的调节、针孔孔径的调节和荧光信号的采集、转换、处理等一系列操作都由计算机系统进行设置和调控。

激光扫描共聚焦显微镜整套成像系统最好安装在一间单独的、宽敞、相对避光的房间，保证操作时安静不受外界太多干扰。同时，房间内最好放置一个实验台，以便进行相关的实验准备和操作（图 29-3，见书后彩图）。



图 29-3　激光扫描共聚焦显微镜操作系统

第二节　激光扫描共聚焦显微镜成像应用

一、荧光探针的选择及标记方法

（一）荧光探针的选择

荧光是指电子直接从单重激发态以辐射方式跃迁到基态的过程中发射的光，这个过程很不稳定，持续的时间也比较短。激光扫描共聚焦显微镜主要功能就是检测具有荧光的样品。因此，对自身不发荧光的样品进行荧光标记是激光扫描共聚焦实验的关键一环，直接决定着实验的成功与否。选择合适的荧光探针是顺利开展实验并获取理想实验结果的前提。激光扫描共聚焦荧光探针的选择主要从以下几个方面考虑：①仪器所配备的激光器类型。例如，德国莱卡公司激光扫描共聚焦显微镜 TCS SP2 通过配备激发波长分别为 488nm、543nm 和 633nm 的氪、氩及氦氖离子激光管以及紫外激光管，就可以适用于多种荧光探针激发的不同需要。②荧光探针的特异性和毒性。最好选用特异性高且毒性小的荧光探针。对于活细胞或组织的荧光标记，荧光探针对细胞的毒性直接影响实验结果。③荧光探针的灵敏度、强度和稳定性。最好选用在相同实验条件下重复性好、不易淬灭、强度适宜的荧光探针。④荧光探针的光漂白性。在检测细胞内的荧光标记物时需要荧光探针稳定性越高越好，然而，在检测细胞膜流动性时则要求荧光探针既要有一定的光稳定性还要有一定的光漂白性。在检测活细胞的膜流动性时通常先利用高强度激光照射细胞的某一区域，使该区域的荧光分子发生淬灭，这种现象称为荧光光漂白。继而发生荧光光漂白区域周围未淬灭的荧光分子会以一定速率向受照射的区域扩散，这种现象称为荧光光漂白恢复。荧光光漂白恢复的扩散速率能够通过激光扫描共聚

焦显微镜进行实时监测，从而用于研究细胞骨架的构成和细胞间通讯等。⑤荧光检测的定性或定量。做荧光定性或仅观察荧光动态变化时，选择单波长激发探针。做定量测量时需要制定标准工作曲线，最好选用双波长激发的比率探针。⑥荧光探针适用的 pH 环境。大多数情况下细胞的 pH 在生理条件下，但当 pH 不在此范围时，应该考虑选择适用该环境 pH 的荧光探针。⑦不同荧光探针之间的相互影响。多种荧光探针进行标记时要考虑它们之间是否存在光谱交叉，彼此发射光谱重叠越少越好、相距越远越好。近年来荧光探针的研发非常迅速，每年都有新的荧光探针问世，美国 Molecular Probes 公司提供了近千种荧光探针可供研究者选择。

（二）荧光探针的标记方法

1. 直接法

抗体与荧光探针直接偶联，直接对细胞或组织表面及内部的已知抗原进行标记。该方法操作简便、特异性强，但灵敏度相对较低，且每种待检测抗原均需制备相应的特异性荧光抗体，实际应用时具有一定局限性。

2. 间接法

抗体不直接偶联荧光探针，而是借助偶联荧光探针的抗抗体（二抗）间接检测已知抗原。将已知抗原的抗体与细胞或组织表面及内部的抗原结合后，再用标记有荧光探针的抗抗体（二抗）与一抗相结合，从而检测相应抗原分布与数量的变化情况。该方法灵敏度高于直接法，而且制备一种荧光抗体可用于检测多种抗原。在激光扫描共聚焦显微镜荧光探针的标记中较为常用。

任何荧光探针标记的过程都要避光操作，防止荧光的淬灭。荧光标记好后要尽快进行检测，防止细胞干燥、荧光淬灭、蛋白质降解，影响实验结果。有关荧光探针的选择与标记可进一步参见第十二章。

二、激光扫描共聚焦显微镜在免疫学中的应用

激光扫描共聚焦显微镜检测的内容和应用范围非常广泛，以下主要介绍其在免疫学中的相关应用。

（一）细胞骨架的观察与检测

细胞骨架是细胞结构的基本成分，主要包括微管、微丝和中间丝。它们能影响细胞大小、形状、分裂、吸收和分泌等多种生理活动。其中微丝的主要成分是肌动蛋白，微管的主要成分是微管蛋白。在激光扫描共聚焦显微镜应用中标记细胞骨架最常用的荧光探针包括标记微丝 F-肌动蛋白的鬼笔环肽及其衍生物荧光探针和标记微管蛋白的秋水仙碱荧光探针。细胞骨架的微丝肌动蛋白在免疫突触的形成过程中发挥着重要作用，因此，在免疫学研究中研究人员可以利用激光扫描共聚焦显微镜对微丝肌动蛋白的表达与分布进行观察，从而观测免疫突触的形成。

（二）细胞器的观察与检测

真核细胞细胞器主要包括线粒体、溶酶体、内质网、高尔基复合体等。传统的光学

显微镜由于分辨率有限，无法观察上述细胞器结构，而激光扫描共聚焦显微镜的出现解决了这一难题。激光扫描共聚焦显微镜不仅可以动态观察活细胞状态下细胞器的形态学改变，而且还可以通过光学切片即断层扫描技术进行三维重建，显示细胞器内部的空间结构与变化。标记细胞器的荧光探针大多都能够直接渗透到细胞内部特异性地与相应的细胞器相结合。

1. 线粒体检测

线粒体是细胞的能源站，同时也与细胞的凋亡密切相关。特异性标记线粒体的荧光探针较多，包括 MitoTracker、MitoFluor、罗丹明 123 及其衍生物、JC-1、DASPMI、DASPEI 等。其中 MitoTracker 和罗丹明 123 较常用于激光扫描共聚焦显微镜中线粒体的检测。

MitoTracker 探针是具有细胞通透性的线粒体探针，含有柔和的巯基反应性氯甲基成分，可以保证细胞固定后荧光探针仍能与线粒体结合。MitoTracker 标记线粒体过程非常简单，只要将其在 37℃ 与细胞共孵育 20min，探针即可通过被动扩散方式穿过细胞膜，在有活性功能的线粒体内聚集，标记好后细胞即可用醛基固定剂进行固定，然后上机检测。MitoTracker 探针有很多种类，其中最常用的是 MitoTracker Green FM 探针，其激发波长为 490nm，发射波长为 516nm。MitoTracker Green FM 探针标记的线粒体在荧光显微镜下呈现绿色荧光，其灵敏度和光稳定性比罗丹明 123 要好，较低浓度的 MitoTracker Green FM 即可产生很好的效果。另外，MitoTracker Green FM 探针只有在线粒体的脂质环境中聚集时才会产生荧光，在水中无荧光，因此，荧光标记时背景荧光干扰很小。鉴于 MitoTracker Green FM 探针的上述特点，研究人员经常将其与红色荧光探针一起配合使用，用于双标记荧光检测。

罗丹明 123 是较早使用的标记线粒体的荧光探针，它是一种细胞通透性的、阳离子、相对无毒的荧光探针，主要用于标记有活性的线粒体，激发波长为 505nm，发射波长为 534nm，被标记的线粒体荧光显微镜下呈现绿色荧光。罗丹明 123 能够迅速地被线粒体摄取，然而如果线粒体的膜电位消失，罗丹明 123 则很容易从细胞内脱落。因此，罗丹明 123 不适用于那些经过固定剂固定后的细胞线粒体的荧光标记。

2. 溶酶体检测

溶酶体是胞质内由单层生物膜包绕的、内含一系列酸性水解酶的小体。溶酶体分为初级溶酶体和次级溶酶体，是细胞内物质代谢的重要场所。特异性标记溶酶体的荧光探针包括 LysoTracker 和 LysoSensor，其中 LysoTracker 是目前溶酶体检测最常用的荧光探针。

LysoTracker 探针通常由一个荧光基团和一个弱碱基相连，可自由穿透细胞膜，特定地集中在溶酶体中。LysoTracker 探针有很多种类，其中较为常用的是 LysoTracker Red DND-99 探针，激发波长为 577nm，发射波长为 590nm。LysoTracker Red DND-99 探针标记的溶酶体在荧光显微镜下呈现红色荧光，其灵敏度和光稳定性比较好，较低的使用浓度即可获得理想的结果。细胞标记过程简单易行，只需将其在 37℃ 与细胞共孵育 20min，探针即可通过被动扩散穿过细胞膜聚积至溶酶体，标记好后细胞用醛基固定剂固定也不影响其检测。LysoTracker Red DND-99 探针经常与 488nm 波长激发的绿色荧光探针一起使用，用于双标记荧光检测。

3. 内质网检测

内质网是细胞内的一个精细的膜系统，是交织分布于细胞质中的膜的管道系统，两膜间是扁平的腔、囊或池。内质网分两类，一类膜上附着核糖体颗粒，称粗面内质网；另一类没有核糖体附着，表面光滑，称滑面内质网。粗面内质网的功能是合成蛋白质大分子，并负责把它从细胞内输送至细胞外或在细胞内转运到其他部位。凡蛋白质合成旺盛的细胞，粗面内质网通常比较发达。滑面内质网的功能与糖类和脂类的合成、解毒、同化作用有关，并且还具有运输蛋白质的功能。特异性标记内质网的荧光探针包括 ER-Tracker 和 DiOC6（3），目前 ER-Tracker 较为常用。

由于 ER-Tracker 探针是一种细胞通透性的、细胞毒性小、内质网特异性的荧光探针，近年来已经逐渐取代了 DiOC6（3），成为荧光标记内质网的首选探针。ER-Tracker 探针包括 3 种类型：ER-Tracker™ Blue-White DPX、ER-Tracker™ Red 和 ER-Tracker™ Green，三者的激发波长分别为 374nm、504nm 和 587nm，发射波长分别为 430～640nm、511nm 和 615nm。可以根据实验搭配的需要选择使用。细胞经 ER-Tracker 标记后可以使用醛基固定剂进行固定。值得注意的是，ER-Tracker Red 和 ER-Tracker Green 染色的细胞不能用 Triton X-100 进行通透，因为 Triton X-100 通透处理会导致 ER-Tracker 的荧光染色消失，但是 ER-Tracker Blue-White DPX 不受影响。

4. 高尔基体检测

高尔基体是由数个扁平囊泡堆在一起形成的高度有极性的细胞器，常分布于内质网与细胞膜之间，呈弓形或半球形，凸出的一面对着内质网称为形成面（forming face）或顺面（cis face）；凹进的一面对着质膜称为成熟面（mature face）或反面（trans face）。顺面和反面都有一些或大或小的运输小泡，在具有极性的细胞中，高尔基体通常大量分布于分泌端的细胞质中。高尔基体的主要功能是将内质网合成的蛋白质进行加工、分类与包装，然后分门别类地送到细胞特定的部位或分泌到细胞外。常用的特异性标记高尔基体的探针有 NBD C_6-ceramide、BODIPY FL C_5-ceramide 和 BODIPY TR ceramide，三者的激发波长分别为 466nm、505nm 和 589nm，发射波长分别为 536nm、511nm 和 617nm。其中 NBD C_6-ceramide 在活细胞和固定后的细胞中都可以对高尔基体选择性标记，被广泛用于高尔基体的研究，而 BODIPY TR ceramide 则更适合于荧光双标记实验。

（三）细胞核的观察与检测

激光扫描共聚焦显微镜技术可以通过检测核酸的定位、定性和定量对细胞核进行观察和检测。能够特异性与核酸结合的荧光探针有很多，较为常用的是 DAPI、Hoechst33342、PI 和 AO。

DAPI 是一种细胞毒性小、特异性强、分辨率高的 DNA 特异性的荧光探针。它以非嵌入的形式结合 DNA 的 A-T 碱基区，激发波长为 345nm，发射波长为 460nm，荧光显微镜下呈明亮的蓝色荧光。DAPI 既可以对活细胞的 DNA 进行荧光标记，也可以标记固定后的细胞，一般可应用于检测细胞的增殖、凋亡、细胞周期和测定细胞的数量。

PI 是一种广泛应用的核酸探针，可以嵌入到 DNA 和 RNA 碱基对，无碱基特异

性，因此，可以同时标记双链 DNA 和 RNA。PI 标记核酸快速、稳定，其激发波长为 536nm，发射波长为 617nm。如果将细胞进行 RNA 酶的预处理，可以去除双链 RNA 的干扰，从而对 DNA 进行定性、定量检测。PI 可以标记活细胞，通过检测细胞膜的完整性，可以对细胞的膜损伤和细胞凋亡进行检测。PI 也可以标记固定的细胞，从而显示细胞核或染色体的形态，定量检测核酸，还可以检测细胞周期、细胞凋亡、核酸的分布与含量、细胞核的定位等。

上述两种核酸荧光探针的标记都十分简单易行，只要将其与细胞共孵育 20min 左右即可。由于 DAPI 属于紫外线激发，其激发光谱与其他荧光探针有较大的分离，因此更适用于双荧光标记实验。

（四）细胞内钙离子的实时定量观察与检测

常用于标记钙离子的荧光探针有 Fluo-3、Rhod-1、Indo-1 和 Fura-2。前两者为单波长激发探针，为钙定性检测探针；后两者与钙结合后其激发或发射光谱会发生偏移，为双波长激发探针，为钙定量检测探针。其中，激光扫描共聚焦显微镜技术中最常用的检测钙离子探针是 Fluo-3 及其衍生物 Fluo-4。Fluo-3 不需要紫外线激发，避免了紫外光对活细胞样品的损伤，激发波长为 488nm，发射波长为 525～530nm，荧光发射峰波长较长，荧光选择性强，自身无荧光，以乙酰羟甲基酯（AM）形式进入细胞后 AM 被分解，Fluo-3 与游离钙离子结合后才发出荧光，能有效避免非特异性染色。另外，Fluo-3 不需制作工作曲线，能够在检测钙离子的同时检测其他参数。Fluo-4 是近年来研发的 Fluo-3 的衍生物，在相同的激发下 Fluo-4 能够产生更强的荧光。

如需定量检测细胞内的钙离子，可联合使用 Fluo-3 和 Fura-2，两者联合使用既具有双波长激发探针的优点又具有单波长激发探针的优点。Fura-2 是一种独特的钙离子荧光探针，荧光强度随 Fura-2 和钙离子结合的增加而减少，即荧光强度与游离钙离子浓度成反比，与 Fluo-3 正好相反，因此，Fluo-3 和 Fura-2 联合使用不仅可以提供一种定量检测细胞内钙离子的比率方法，还可增加钙离子检测的灵敏度。定量检测细胞内钙离子也可同时使用双波长激发探针 Indo-1 和 Fura-2，由于这些探针需要用比率技术，因此又称钙比率探针。例如，Indo-1 荧光探针经 320～360nm 波长紫外线激发后细胞内游离的 Indo-1 发出 485nm 荧光，与钙离子结合的 Indo-1 发出 405nm 荧光，两者的比值与细胞内钙离子成线性关系，此比值与标准工作曲线相比即可得出细胞内游离钙离子的浓度。钙比率探针在溶液中均有荧光，测量时需洗去细胞外液探针。同时由于这些探针需要紫外线作为激发光源，会造成细胞损伤，还会增加潜在的自发荧光，而且荧光发射峰波长也较短，需提高发光强度，因而其使用受到很大限制。

（五）细胞内大分子相互作用的观察与检测

1. 双荧光标记法

激光扫描共聚焦显微镜技术可以通过双荧光标记法对细胞内大分子之间的相互作用进行观察，对靶分子的表达和分布进行检测。一般多采用间接法进行标记，即先用细胞内大分子特异性的抗体标记相应的靶分子，然后再用两种不同的二抗荧光探针分别标记

两种大分子的特异性抗体，从而间接地观察两种大分子之间的相互作用。通常选择激发光谱能足够分离并且发射光谱尽量较少重叠的绿色荧光探针和红色荧光探针配对使用，如果两种大分子发生了相互作用，在激光扫描共聚焦显微镜下就能够观察到橙黄色的荧光，表明两种大分子可能发生了共定位现象。但是，这种双荧光标记法只能间接地反映细胞内大分子之间的相互作用，若要直接确定两种大分子之间的相互结合，可以选择荧光共振能量转移的方法。

2. 荧光共振能量转移

荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）是指当一个荧光分子（供体）处于激发状态时能够将其产生的能量传递给相邻的另一个荧光分子（受体）并使其激发的过程（图 29-4，见书后彩图）。也就是说，当供体荧光分子和受体荧光分子之间相互靠近达到一定的距离时，用供体荧光分子的激发波长激发供体荧光分子，在荧光显微镜下可以看到供体荧光分子的荧光强度比其单独存在时低许多，而受体荧光分子的荧光强度却明显增强。因此，在两个不同荧光分子中，只有供体荧光分子的发射光谱与受体荧光分子的激发光谱有一定的重叠，并且两个荧光分子之间的距离小于 10nm 时，才能够观察到 FRET。

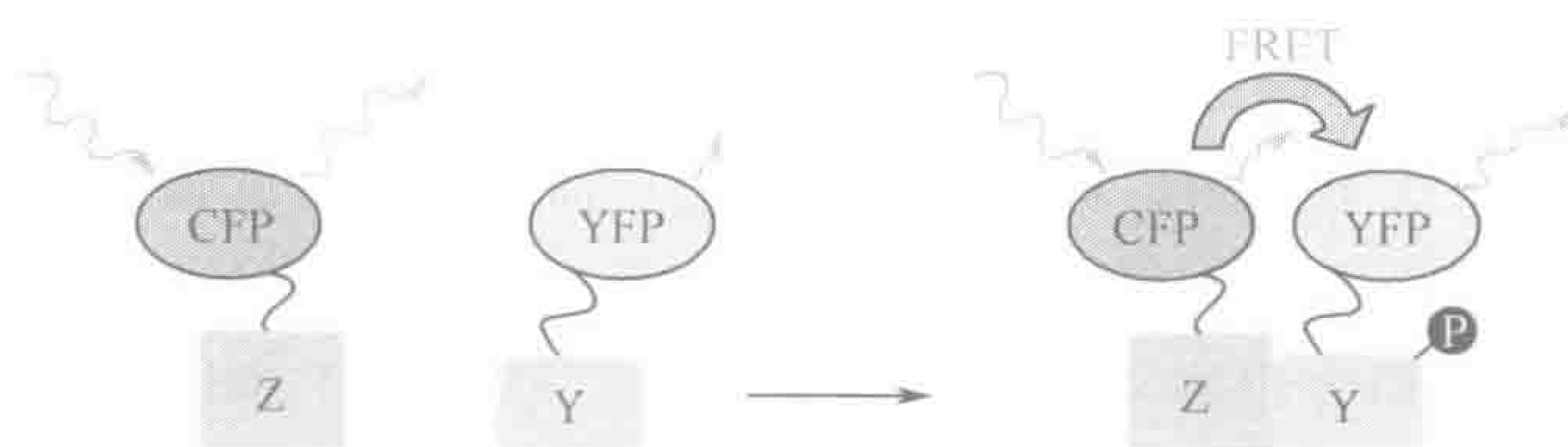


图 29-4　FRET 原理图

选择合适的供体荧光分子与受体荧光分子配对是 FRET 实验成功的关键，应考虑以下两点：①供体荧光分子与受体荧光分子的激发光谱应有较大的分离，能够确保分别检测到它们各自的荧光。②供体荧光分子的发射光谱与受体荧光分子的激发光谱应该有足够的重叠，确保供体荧光分子的发射光谱能够充分激发受体荧光分子。目前最常用于 FRET 检测的一对荧光探针是 CFP 和 YFP。CFP 的激发波长为 436nm、发射波长为 476nm，YFP 的激发波长为 516nm、发射波长为 529nm。CFP 与 YFP 这对荧光分子能够检测到距离 5.2nm 的 FRET 反应。

FRET 能够用来研究细胞内两个大分子之间的相互作用及分子构象的改变，是目前检测两个蛋白质分子是否直接发生相互作用的有力手段，包括受体与配基的相互作用、构型依赖的受体激活、信号分子的装配、细胞内效应分子以及基因转录的激活等。

三、激光扫描共聚焦显微镜应用举例

以下将通过具体的应用举例介绍一下免疫学研究中常见的与脂筏运动、细胞骨架重排、细胞内大分子间相互作用、细胞内大分子与细胞器相互作用和细胞内钙流的监测等相关的激光扫描共聚焦显微镜技术的应用。

(一) alpha-黑素细胞刺激素调节T细胞活化的相关机制研究

alpha-黑素细胞刺激素（alpha-melanocyte stimulating hormone，α-MSH）作为神经肽和神经内分泌激素在免疫调节中发挥着重要的作用，是一种有效的抗炎和免疫调节分子。α-MSH的受体有5种，分别命名为MC1R～MC5R，都与G蛋白偶联，属于Ⅰ型与G蛋白偶联受体家族，具有七次跨膜结构，其中MC1R、MC3R、MC5R参与免疫调节。MCR具有高度同源性（42%～67%），为目前已知的最小的G蛋白偶联受体，功能性的偶联腺苷酸环化酶（adenylate cyclase，AC）。α-MSH结合MCR后，激活G蛋白活化亚基Gs，Gs活化AC，AC催化ATP转化为cAMP，胞质cAMP的升高激活蛋白激酶A（protein kinase A，PKA），PKA可以通过磷酸化作用影响胞内信号的转导并发挥一系列的生物学效应。

在T细胞活化过程中，T细胞与抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC）的相互作用需要细胞表面分子的相互结合，如TCR/CD3-MHC/Ag、CD28-CD80、LFA-1-ICAM-1等，从而形成稳定、紧密的相互接触结构——免疫突触（immunological synapse，IS），并持续传递活化信号。免疫突触可以通过排列膜蛋白而将受体和配体分配入成熟的突触，其中央部位为中央超分子活化簇（central supramolecular activation cluster，cSMAC），cSMAC主要特点就是富含TCR、CD4/8、CD28、PKC-θ、CD2以及其他信号分子的受体，围绕在cSMAC周围的是外周SMAC（peripheral supramolecular activation cluster，pSMAC），后者富含LFA-1、踝蛋白（talin）、VLA-4、转铁蛋白受体（TfR）等。IS的有效形成是触发TCR信号的关键，有利于T细胞与APC之间最大限度的接触，使得信号分子之间最大限度地结合以启动相应的信号通路，最终使T细胞彻底活化。

脂筏为富含胆固醇和鞘磷脂的细胞膜结构微域，其主要功能是募集信号蛋白分子并提供信号分子在质膜发生相互作用的平台。在IS形成过程中，细胞膜脂筏微域聚集于cSMAC部位，富集一些有利于TCR信号发生的分子如TCR、CD3、LAT、ZAP-70、Lck等到IS部位，同时又将一些不利于IS形成的大分子如CD45排除于脂筏区域之外，以利于免疫突触的形成。在静息T淋巴细胞中，脂筏均匀地分布于细胞膜。当T细胞接受抗原刺激或表面分子被交联后，脂筏发生聚集，并负责募集与信号发生有关的信号蛋白到激发部位（尤其是在免疫突触形成过程中），触发有效的TCR信号并向胞内转导活化信号。在脂筏聚集和免疫突触形成过程中，胞膜内侧与胞膜相连的细胞骨架肌动蛋白发挥着重要作用，细胞骨架肌动蛋白一方面参与脂筏的聚集和细胞膜上信号分子的移动，使外界信号有效的向细胞内传递；另一方面，细胞骨架肌动蛋白也发挥着信号传递的作用。连接细胞膜与胞内细胞骨架肌动蛋白的接头蛋白有Talin、ERM（ezrin-radixin-moesin）、EBP50（ERM-binding phosphor-protein of 50 000 molecular weight）等，这些接头蛋白在IS形成过程中发挥重要的作用。

研究表明人外周血T淋巴细胞表达5种MCR（MC1R～MC5R），α-MSH可以抑制丝裂原（PHA）诱导的T淋巴细胞增殖，抑制核转录因子NF-AT的DNA结合活性，从而抑制IL-2的合成。为了进一步研究α-MSH对T细胞脂筏的运动、细胞骨架蛋白的重排、相关信号转导分子的表达和细胞因子的分泌等影响，作者利用激光扫描共聚焦显微镜技术探讨了α-MSH调节T细胞活化的相关机制。

1. α-MSH 对 T 淋巴细胞活化过程中脂筏运动的影响

原理

利用美国 Molecular Probes 公司生产的 Vybrant® Alexa Fluor® 555 Lipid Raft Labeling Kit 来标记脂筏。脂筏内含有神经节苷脂（GM1），可以与霍乱毒素 B 亚单位（CT-B）特异性地结合。因此，先用荧光素 Alexa Fluor 555 偶联 CT-B 的荧光探针标记活细胞，该荧光素偶联的 CT-B 与脂筏内 GM1 的戊多糖链相结合。再加入 CT-B 特异性的抗体，与荧光素偶联的 CT-B 标记的脂筏相交联，从而增强脂筏在激光扫描共聚焦显微镜下检测的灵敏度。

材料与试剂

Jurkat 细胞株 JE6-1
α-MSH
含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基
Vybrant® Alexa Fluor® 555 Lipid Raft Labeling Kit（V-34404）
4 %多聚甲醛固定液
1×PBS
0.1% Triton X-100 打孔液
多聚赖氨酸（PLL）黏附剂
封片剂
盖玻片，载玻片
CO_2 培养箱
超速台式低温离心机
激光扫描共聚焦显微镜

步骤

1）离心收集不同因素和不同时间处理的 Jurkat T 淋巴细胞，预冷 1×PBS 离心洗涤 3 次。
2）按照试剂说明书指示，用 2ml 荧光素 Alexa Fluor 555 偶联 CT-B 的荧光探针工作液标记细胞，4℃避光孵育 10min，预冷 1×PBS 洗 3 次。
3）用 2ml 预冷的抗 CT-B 抗体的工作液悬浮细胞，4℃避光孵育 15min，预冷 1×PBS 洗 3 次。
4）预冷 4% 多聚甲醛固定液固定细胞，室温下避光孵育 15min，预冷 1×PBS 洗 3 次。
5）将细胞铺于多聚赖氨酸（PLL）预处理的盖玻片上。
6）尽快上机检测。如需长期保存，可用封片剂封片后放于 4℃保存。

结果

T 淋巴细胞经抗 CD3 和抗 CD28 抗体刺激活化后，在短时间内（10min）即可引起脂筏的极化并聚集成簇（图 29-5，见书后彩图），以募集信号蛋白传递外界刺激信号。α-MSH和抗体联合作用于 T 淋巴细胞后，脂筏聚集成簇现象 10min 后被显著抑制（图

29-5，见书后彩图）。因此该结果提示 α-MSH 抑制了 T 淋巴细胞活化过程中脂筏的聚集。

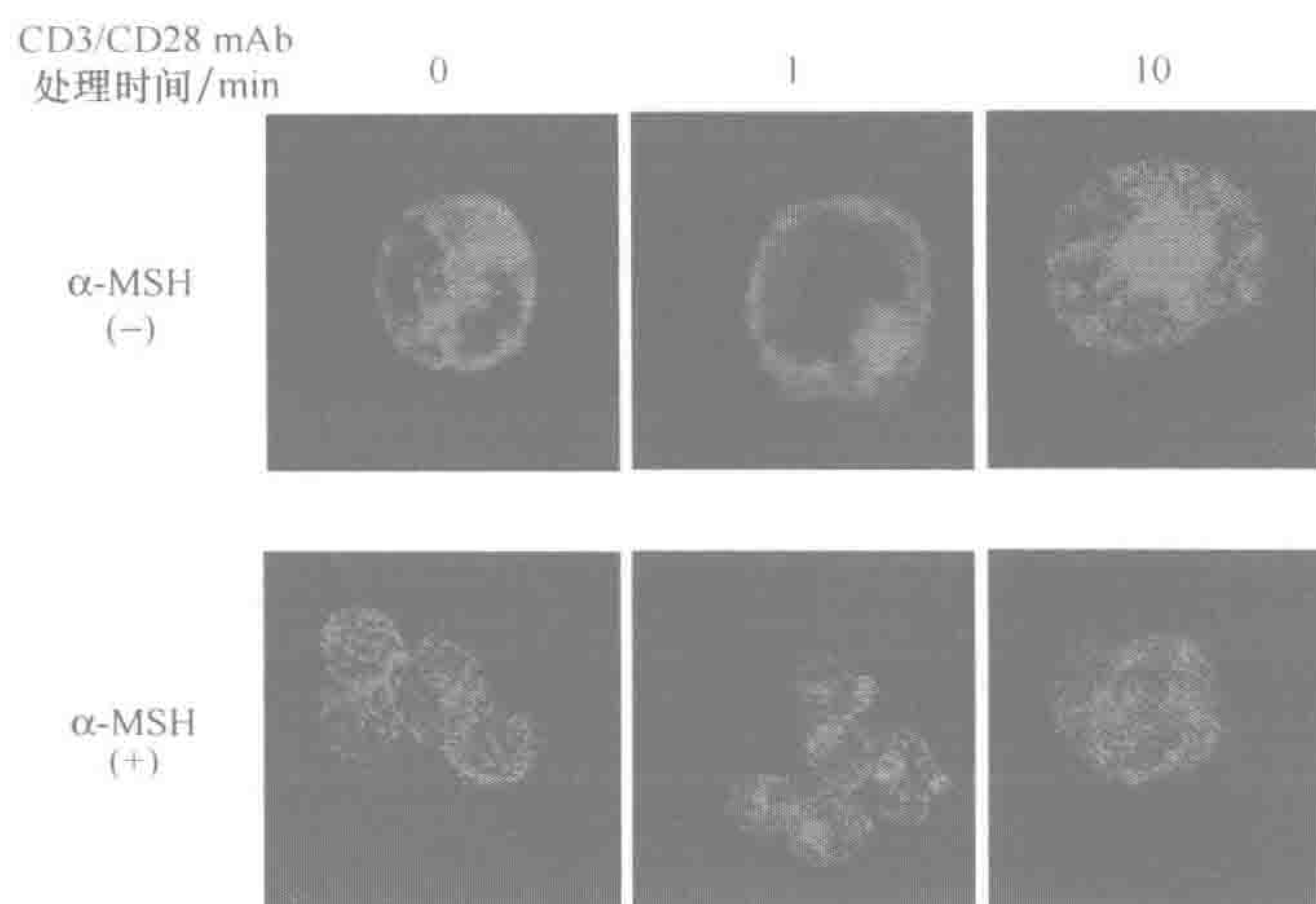


图 29-5　α-MSH 对 T 淋巴细胞活化过程中脂筏聚集的影响

2. α-MSH 对 IS 形成过程中细胞骨架微丝肌动蛋白重排的影响

原理

用美国 Molecular Probes 公司生产的蓝色荧光细胞示踪染料 CMAC 标记抗原提呈细胞（APC）Raji B 淋巴细胞株。用 Sigma 公司生产的四甲基罗丹明（TRITC）标记鬼笔环肽作为荧光探针检测细胞骨架中的微丝肌动蛋白重排。

材料与试剂

Raji B 淋巴细胞株
Jurkat T 淋巴细胞株
CMAC（C2110，Molecular Probe）
TRITC 标记的鬼笔环肽荧光探针（Sigma）
4 %多聚甲醛固定液
1×PBS
0.1% Triton X-100 打孔液
多聚赖氨酸（PLL）黏附剂
封片剂
盖玻片，载玻片，CO_2 培养箱，超速台式低温离心机，激光扫描共聚焦显微镜

步骤

1）按照说明书配置 CMAC 贮存液（DMSO 溶解至 10mmol/L 浓度）。用无血清培养基将贮存液稀释成 0.5～25μmol/L 浓度的工作液，4℃保存。使用前需预热至 37℃。

2）收集 Raji B 淋巴细胞，重悬于含 10μmol/L CMAC 的 RPMI 1640 培养液中，37℃避光孵育 30min，1×PBS 洗 1 次，重悬于含 5 %胎牛血清的 RPMI 1640 中，调整密度为 1×10^6 个/ml。

3）收集 Jurkat T 淋巴细胞，1×PBS 洗 1 次，重悬于含 5 %新生牛血清的 RPMI 1640 中，调整密度为 1×10^6 个/ml。

4）将 0.5ml Jurkat T 淋巴细胞和 0.5ml Raji B 淋巴细胞混合，室温 500*g* 下离心 5min。小心弃除 0.5ml 上清，细胞沉淀于 37℃培养箱避光孵育 15min。

5）充分吹散细胞，将细胞铺于多聚赖氨酸预处理的盖玻片上，37℃培养箱避光孵育 30min。

6）1×PBS 洗 1 次，预冷 4%多聚甲醛固定液室温下避光固定细胞 15min，1×PBS 洗 3 次。

7）预冷 0.1% Triton X-100 打孔液室温下避光孵育细胞 10min，使细胞膜通透性增加，1×PBS 洗 3 次。

8）加入 TRITC 标记的鬼笔环肽，室温下避光标记 20min。

9）尽快上机检测。如需长期保存，可用封片剂封片后放于 4℃保存。

结果

CMAC 标记的抗原提呈细胞（APC）Raji B 淋巴细胞株显微镜下呈蓝色荧光，与 Jurkat T 淋巴细胞之间相互接触，形成 IS。IS 部位的细胞骨架微丝肌动蛋白显微镜下呈红色荧光。金黄色葡萄球菌肠毒素 B（SEB）预处理的 Raji B 淋巴细胞与 Jurkat T 淋巴细胞之间接触更加紧密，IS 部位的细胞骨架微丝肌动蛋白明显地聚集，红色荧光显著增强。然而 α-MSH 和 SEB 联合处理组能够明显抑制肌动蛋白的这种聚集，提示 α-MSH 能够抑制 IS 形成过程中细胞骨架的重排（图 29-6，见书后彩图）。

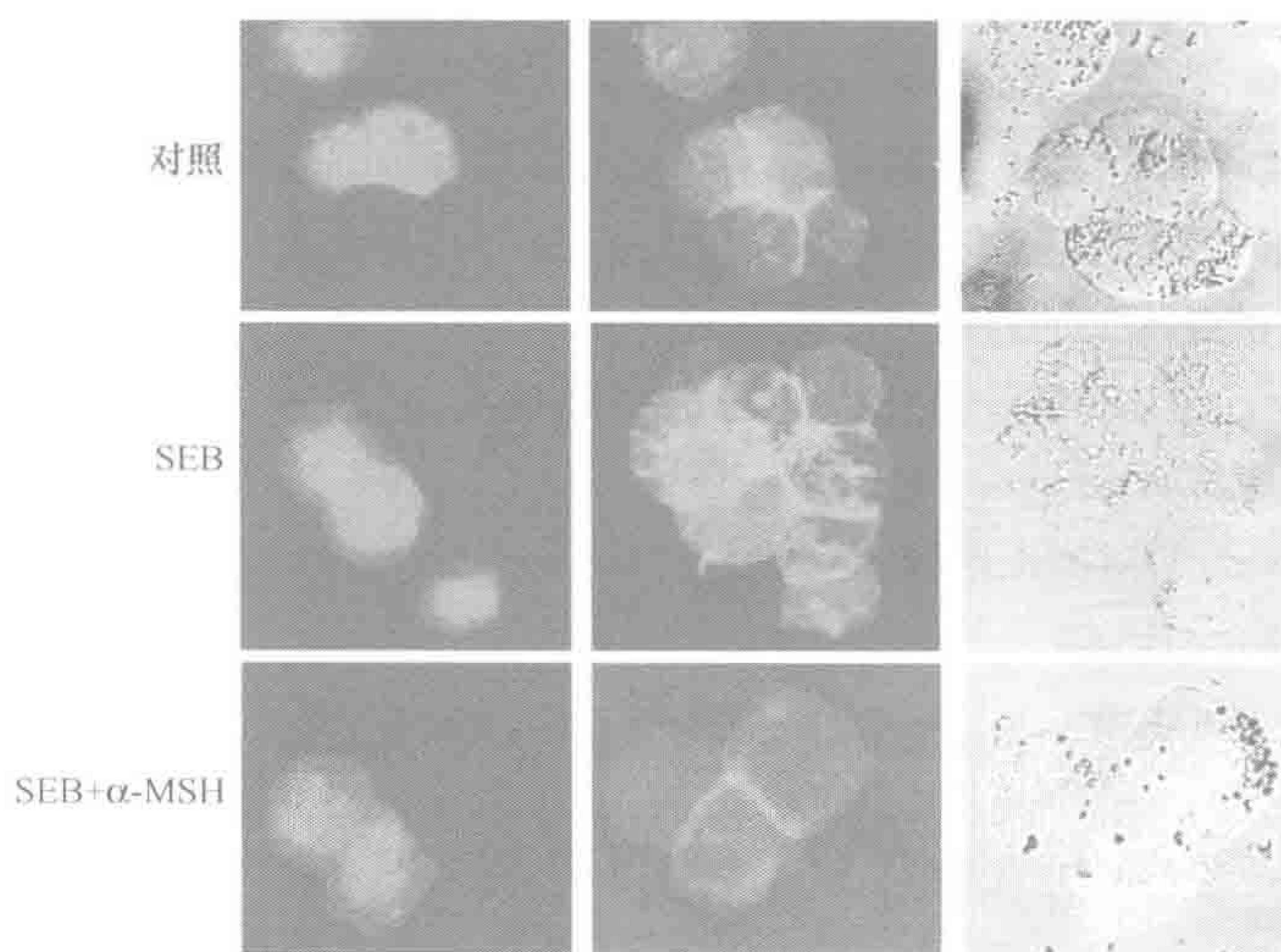


图 29-6　α-MSH 对 IS 形成过程中细胞骨架重排的影响

（二）新型凋亡诱导分子 LAPF 与 p53 相互作用在 TNF 诱导凋亡中的作用机制研究

LAPF 是从正常成人骨髓基质细胞 cDNA 文库中通过大规模随机测序发现的新型全

长基因。同源序列比较发现人和小鼠的 LAPF 基因具有很高的同源性，一致性可达 83%。经过同源搜索，找到了 12 个与 LAPF 具有相同结构特征的未知功能蛋白，由于这些蛋白质都包含一个氨基端的 PH 结构域和一个羧基端的 FYVE 结构域，将它们归为一个新的蛋白家族 Phafins（protein containing both PH and FYVE domain）家族。由于 LAPF 在功能上能够转位至溶酶体诱导细胞凋亡，因此，将其命名为包含 PH 和 FYVE 结构域的溶酶体相关的凋亡诱导蛋白（lysosome-associated and apoptosis-inducing protein containing PH and FYVE domain，LAPF）。

前期研究表明 LAPF 能够诱导小鼠成纤维细胞 L929 细胞凋亡，并且能够增强 L929 细胞对 TNFα 刺激的敏感性，提示 LAPF 是一种促凋亡分子。相关机制研究表明 LAPF 主要通过转位至溶酶体，引起溶酶体膜通透性（LMP）增高，释放组织蛋白酶 D 和组织蛋白酶 L，继而引起线粒体膜通透性（MMP）增高，释放凋亡诱导因子（AIF），以 caspase 非依赖的方式促进细胞的凋亡。在此研究的基础上，作者利用激光扫描共聚焦显微镜技术深入探索了在 TNFα 凋亡刺激下 LAPF 诱导 L929 细胞凋亡的相关机制。

1. hTNF-α 凋亡刺激下 LAPF 与 $Ser^{15/18}$磷酸化 p53 的相互作用

原理

先用抗 LAPF 和 $Ser^{15/18}$磷酸化 p53 的抗体在打孔剂的作用下与 L929 细胞共孵育，使其进入细胞与相应抗原结合，然后用 Invitrogen 公司 FITC 和 Alexa Fluo-555 荧光标记的抗兔和抗鼠二抗荧光探针标记抗 LAPF 和 $Ser^{15/18}$磷酸化 p53 的抗体，从而检测细胞内 LAPF 和 $Ser^{15/18}$磷酸化 p53 的表达与分布情况。

材料与试剂

小鼠成纤维细胞株 L929 细胞
抗 LAPF 抗体
抗 $Ser^{15/18}$磷酸化 p53 抗体
FITC 和 Alexa Fluo-555 荧光标记的抗兔和抗鼠的二抗
人重组的肿瘤坏死因子 α（hTNF-α）
含 10% FCS 的 DMEM 培养基
牛血清白蛋白（BSA）
4 %多聚甲醛固定液
1×PBS
0.1% Triton X-100 打孔液
封片剂
盖玻片，载玻片，超速台式低温离心机，激光扫描共聚焦显微镜

步骤

1）将细胞铺在 6 孔板里的盖玻片上生长，经 hTNF-α 刺激一定时间后，用无血清培养基洗 2 次，去除血清。

2）加入 1ml 4%多聚甲醛固定液至盖玻片上，室温下固定 15～20min，预冷 1×

PBS 洗 3 次。

3）加入 1ml 含 5mg/ml BSA 的 PBS 至盖玻片上，4℃避光预封闭 1h。

4）加入 1ml 0.1% Triton X-100 打孔液至盖玻片上，室温下避光孵育细胞 10min。

5）将抗 LAPF 抗体和抗 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 抗体按 1∶100 稀释在 200μl 打孔液中，然后滴加至盖玻片上，4℃避光孵育 3h 或过夜，预冷 1×PBS 洗 3 次。

6）将 FITC 和 Alexa Fluo-555 荧光素标记的抗兔和抗鼠的二抗按 1∶200 稀释在 200μl 打孔液中，然后滴加至盖玻片上，4℃避光孵育 2h，预冷 1×PBS 洗 3 次。

7）尽快上机检测。如需长期保存，可用封片剂封片后放于 4℃保存。

注意事项

1）铺在盖玻片上的细胞密度对于结果的观察非常重要，细胞不能太多也不能太少。将细胞滴加入有盖玻片的孔中后不宜剧烈晃动，避免盖玻片浮起，大量细胞贴至孔底，导致盖玻片上的细胞数量过少。

2）加固定液、封闭液和打孔液时尽量沿 6 孔板的板壁缓慢加入，不要直接对着盖玻片上的细胞滴加。

3）加抗体时可以在盖玻片的正上方逐滴滴加，依靠液体在玻片上的表面张力散开。孵育过程中要检查含抗体的打孔液是否一直保持在玻片上，必要时可加大液体量，切忌液体过少，导致细胞干掉。

结果

镜下检测发现带 FITC 的荧光二抗标记的 LAPF 蛋白在显微镜下呈现绿色荧光，带 Alexa Fluo 的荧光二抗标记的磷酸化 p53 蛋白在显微镜下呈现红色荧光。在没有 hTNFα 刺激时胞质中 LAPF 和 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 表达较低，胞质中 LAPF 与磷酸化 p53 几乎没有共定位现象。hTNFα 刺激后 6h 胞质内 LAPF 和 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 开始表达增加，在胞质中发生共定位，呈现黄色荧光，至 12h 达到高峰（图 29-7，见书后彩图）。

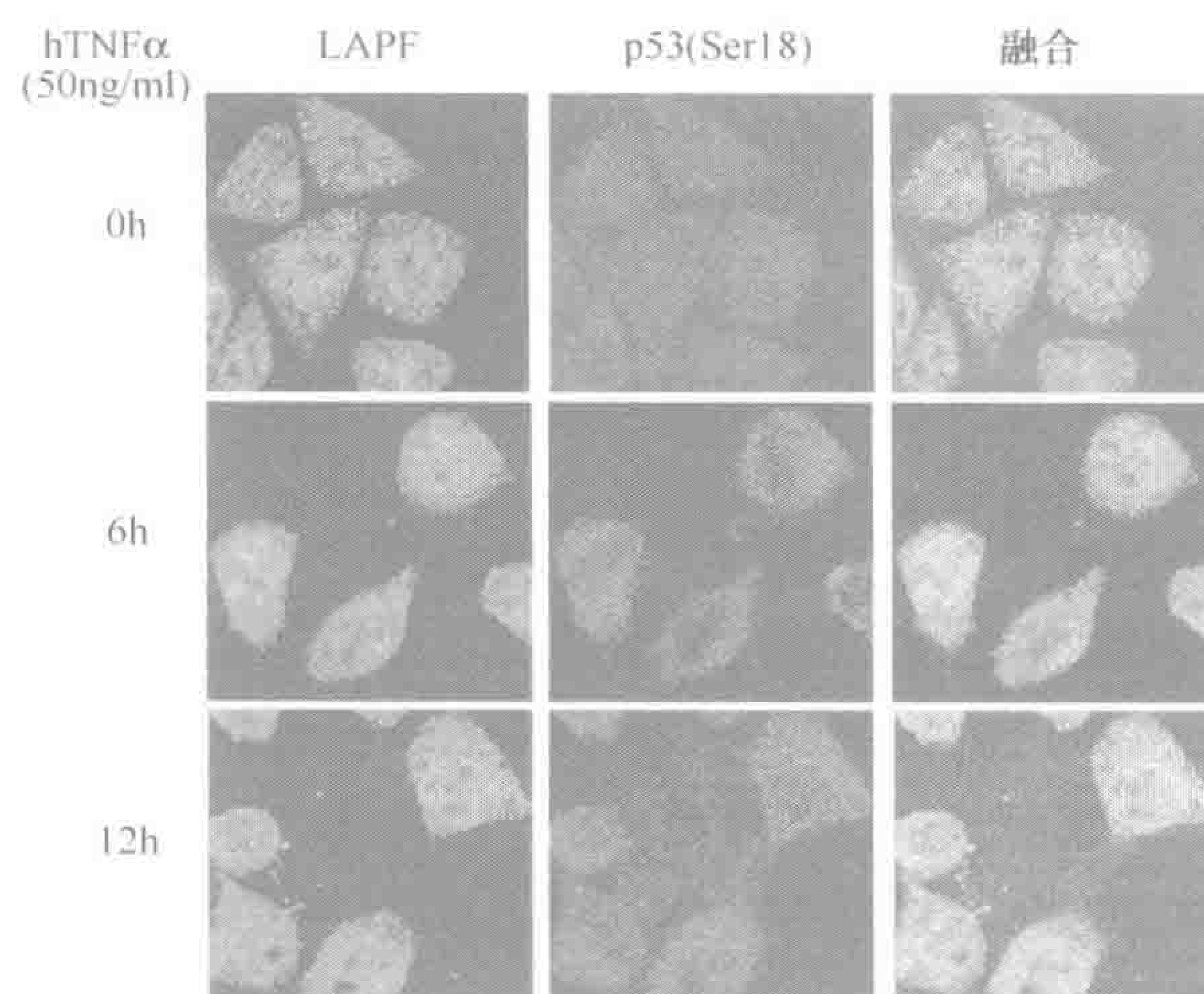


图 29-7　LAPF 与 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 的共定位

2. 观察 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 与溶酶体的相互作用

原理

先用 Invitrogen 公司 Lyso Tracker Red 在活细胞状态下标记溶酶体，然后固定细胞，用抗 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 的抗体在打孔剂的作用下与 L929 细胞共孵育，使其进入细胞与相应抗原结合，再用 Invitrogen 公司 FITC 荧光标记的抗鼠二抗荧光探针标记抗 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 的抗体。从而检测细胞内 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 和溶酶体的相互作用。

材料与试剂

小鼠成纤维细胞株 L929 细胞
抗 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 抗体
FITC 荧光标记的抗鼠的二抗
Lyso Tracker Red 溶酶体荧光探针
人重组的肿瘤坏死因子 α（hTNF-α）
含 10% FCS 的 DMEM 培养基
牛血清白蛋白（BSA）
4 %多聚甲醛固定液
1×PBS
0.1% Triton X-100 打孔液
封片剂
盖玻片，载玻片，超速台式低温离心机，激光扫描共聚焦显微镜

步骤

1）将细胞铺在 6 孔板的盖玻片上生长，经 hTNF-α 刺激一定时间后，用无血清培养基洗 2 次，去除血清。

2）加入含终浓度 100nmol/L 的 Lyso Tracker 溶酶体荧光探针的无血清培养基至平板中，37℃培养箱避光孵育 15min，然后用 1×PBS 洗 3 次。

3）加入 1ml 4%多聚甲醛固定液至盖玻片上，室温下避光固定细胞 15～20min，预冷 1×PBS 洗 3 次。

4）加入 1ml 含 5mg/ml BSA 的 PBS 至盖玻片上，避光预封闭 1h。

5）加入 1ml 0.1% Triton X-100 打孔液至盖玻片上，室温下避光孵育细胞 10min，使细胞通透性增加。

6）将抗 $Ser^{15/18}$ 磷酸化 p53 抗体按 1∶100 稀释在 200μl 打孔液中，然后滴加至盖玻片上，4℃避光孵育 3h 或过夜，预冷 1×PBS 洗 3 次。

7）将 FITC 荧光素标记的抗鼠的二抗按 1∶200 稀释在 200μl 打孔液中，然后滴加至盖玻片上，4℃避光孵育 2h，预冷 1×PBS 洗 3 次。

8）尽快上机检测。如需长期保存，可用封片剂封片后放于 4℃保存。

注意事项

1）铺在盖玻片上的细胞密度对于结果的观察非常重要，细胞不能太多也不能太少。

将细胞滴加入有盖玻片的孔中后不宜剧烈晃动，避免盖玻片浮起，大量细胞贴至孔底，导致盖玻片上的细胞数量过少。

2）加固定液、封闭液和打孔液时尽量沿六孔板的板壁缓慢加入，不要直接对着盖玻片上的细胞滴加。

3）加抗体时可以在盖玻片的正上方逐滴滴加，依靠液体在玻片上的表面张力散开。孵育过程要检查含抗体的打孔液是否一直保持在玻片上，必要时可加大液体量，切忌液体过少，导致细胞干掉。

结果

镜下检测发现带 FITC 的荧光二抗标记的磷酸化 p53 蛋白在显微镜下呈现绿色荧光，Lyso Tracker Red 标记的溶酶体在显微镜下呈现红色荧光。L929 细胞在未刺激时 $Ser^{15/18}$磷酸化 p53 主要在胞质低水平表达，与溶酶体无共定位。hTNFα 刺激后 6h 胞质中 $Ser^{15/18}$磷酸化 p53 表达增强并且明显与溶酶体发生共定位，呈现黄色荧光，提示大部分磷酸化的 p53 转位至溶酶体（图 29-8，见书后彩图）。

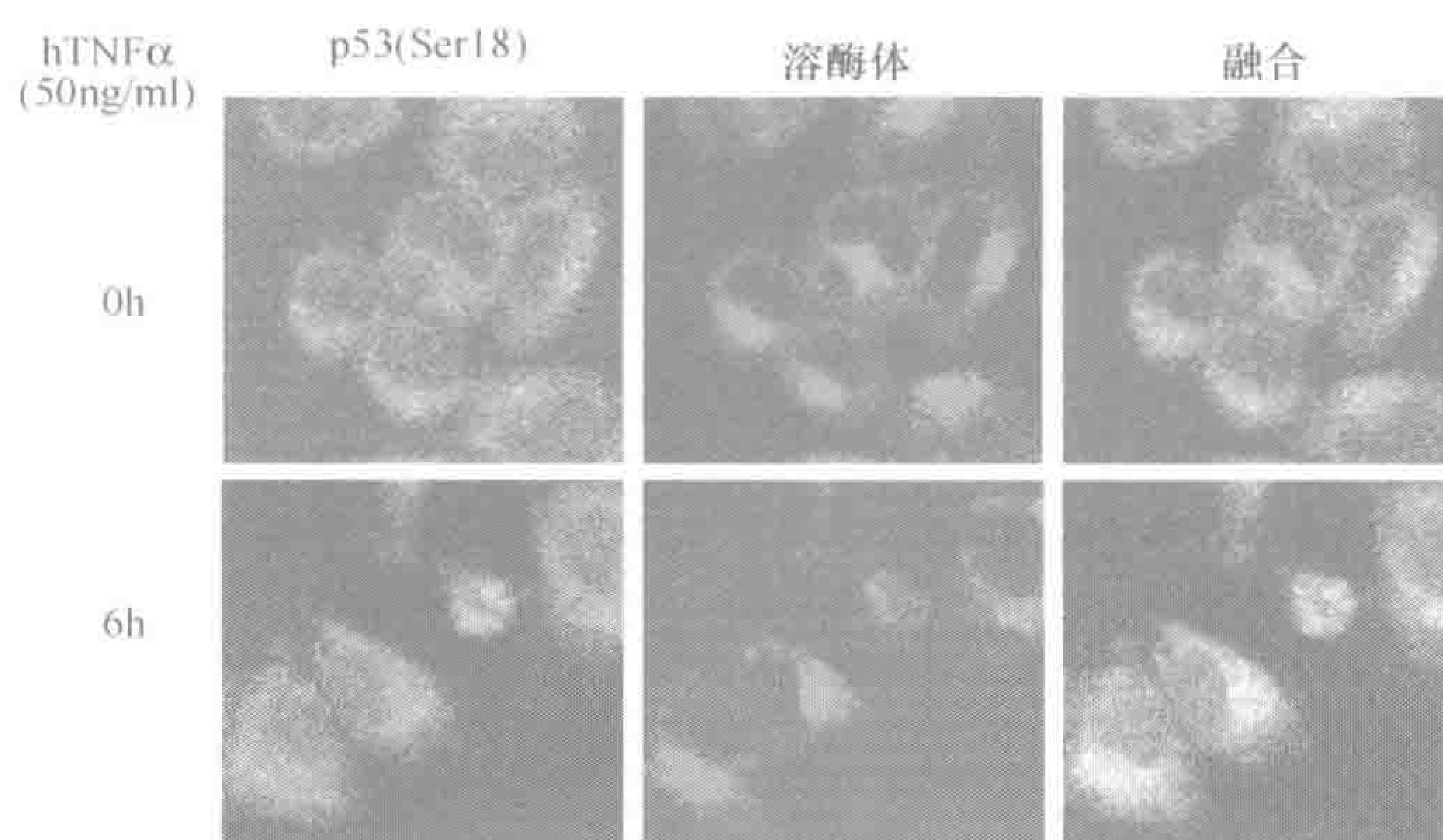


图 29-8　$Ser^{15/18}$磷酸化 p53 转位至溶酶体

（三）TLR 配体刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 对细胞内钙流的影响

Toll 样受体（toll-like receptor，TLR）是一种重要的模式识别受体，主要表达在巨噬细胞和树突状细胞表面，是机体抵抗病原体入侵的第一道防线。TLR 在生物体内高度保守，目前已发现了 11 种哺乳动物的 TLR 分子，分别识别不同的病原体相关的分子模式，如 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR9 分别识别 LTA、dsRNA、LPS、flagellin、CpG 基序。

作为细胞内重要的第二信使之一，Ca^{2+} 在众多生理过程中发挥调节作用。Ca^{2+} 触发的细胞反应大多是通过 Ca^{2+}/钙调素依赖性蛋白激酶（CaMK）家族来完成和调节，在这个丝/苏氨酸蛋白激酶家族中，CaMKⅡ是最广泛存在的，它由 4 个基因编码。α、β、γ、δ 4 种亚单位基本结构类似，都含有 N 端的催化区、C 端的组合区及中间的自身调节区。调节区包含两个部分重叠的抑制区和钙调素结合区。细胞在静息状态时，CaMKⅡ是以 8～12 个亚基的聚合物的状态存在，并且通过自身的抑制结构域抑制了自身的催化活性。当结合了 Ca^{2+} 和钙调素之后 CaMKⅡ就会消除自身抑制作用，引起不

同亚基之间的相互磷酸化以及自身的活化。这种磷酸化的作用能够阻止自身抑制性结构域与激酶结构域的结合从而引发 Ca^{2+}/钙调素非依赖的 CaMKⅡ激酶活性。另外，磷酸化的亚基对钙调素的解离率显著下降，使其亲和力提高了约 1000 倍。这种独一无二的作用机制使 CaMKⅡ能有效的感应瞬间升高的 Ca^{2+} 流的强度和频率。在免疫系统中，CaMKⅡ发挥着重要的调控作用，广泛参与 T 细胞的激活，DC 的成熟以及抗原提呈等。

然而，Ca^{2+} 和 CaMKⅡ在 TLR 触发的天然免疫应答反应中的确切作用，以及 Ca^{2+}/CaMKⅡ信号通路与 TLR 信号通路之间的交互作用尚不清楚。为此，作者利用激光扫描共聚焦显微镜技术观察了 TLR4 的配体 LPS 刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后对细胞内钙流的影响。

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞内钙流的变化

原理

用 Invitrogen 公司钙荧光染料 Fluo-3/AM 标记细胞内钙离子的变化。荧光染料 Fluo-3/AM 进入细胞后 AM 被分解，Fluo-3 与游离钙相结合后发出荧光。

材料与试剂

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞
含 10% FCS 的 DMEM 培养基
LPS
Fluo-3/AM 探针
胞内钙离子螯合剂 BAPTA-AM
胞外钙离子螯合剂 EGTA
1×PBS
多聚赖氨酸（PLL）黏附剂
盖玻片，激光扫描共聚焦显微镜

步骤

1）将 RAW264.7 细胞铺于 6 孔板中涂有多聚赖氨酸的洁净盖玻片上。

2）在培养基中加入 3μmol/L 的 Fluo-3/AM 荧光染料，37℃避光培养 1h。

3）细胞用 1×PBS 洗 1 次后，加入培养基继续培养 30min。

4）将盖玻片小心放置于细胞加样器上（图 29-9），盖玻片有细胞的一面朝上，固定好后置于载物台上，在 10×/0.40 CS 的物镜下每隔 10s 记录 1 次，连续扫描 5 张未加刺激的结果，调整仪器参数。

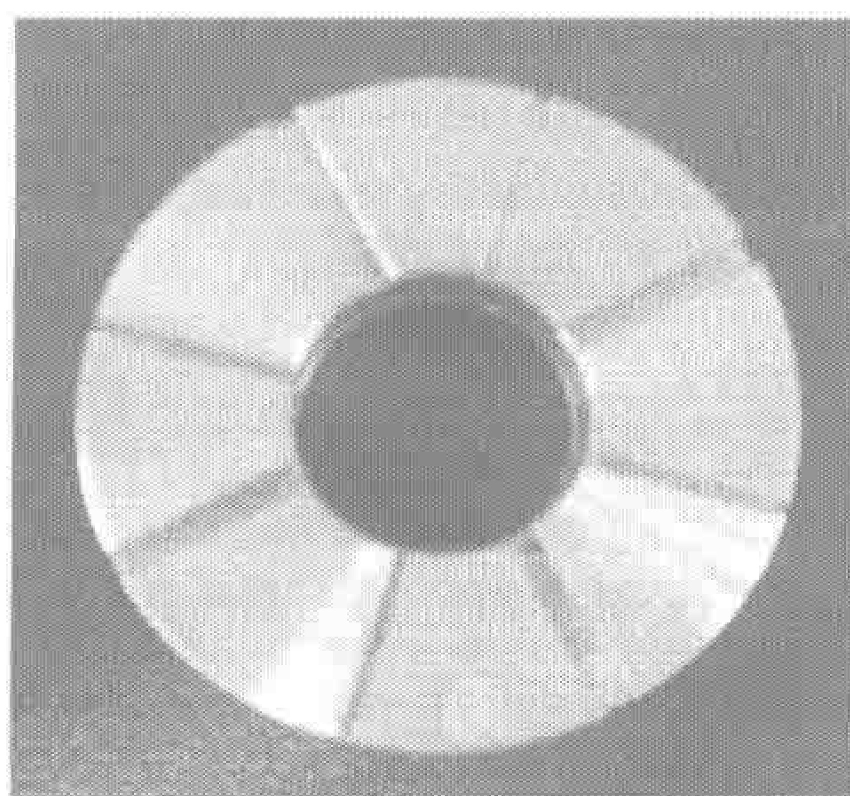


图 29-9　细胞加样器

5）向盖玻片里加入 100ng/ml LPS 刺激细胞，在10×/0.40 CS 的物镜下扫描，每隔 10s 记录 1 次。

6）阻断实验时，按步骤 4）中将盖玻片固定好后，加入 6μmol/L 胞内钙离子螯合剂 BAPTA-AM 或者 1.5mmol/L 胞外钙离子螯合剂 EGTA，15min 后再加入 100ng/ml LPS 刺激细胞，在 10×/0.40 CS 的物镜下扫描，每隔 10s 记录 1 次。

7）荧光图像用 Leica 激光共聚焦显微镜软件分析单个细胞在不同时间点的荧光强度，取 15 个细胞的平均荧光强度得到该组细胞的钙荧光时间变化曲线。

注意事项

1）一般 Fluo-3/AM 的工作浓度为 2～10μmol/L，实验前最好先进行预实验寻找一个最适的工作浓度。

2）盖玻片放置于细胞加样器上时要小心，注意盖玻片的方向，有细胞的一面朝上。

3）由于钙流的变化非常迅速，因此向盖玻片上加刺激时动作要迅速，加完后迅速进行检测。

结果

如图 29-10（见书后彩图）所示，在 LPS 刺激细胞 200s 时，胞内的荧光强度迅速提高了 2～3 倍，大约 8min 恢复到初始水平。如果加入胞内钙离子螯合剂 BAPTA-AM，LPS 诱导的胞内 Ca^{2+} 流就会被阻断，而胞外钙离子螯合剂 EGTA 并没有这种阻断效应，说明升高的 Ca^{2+} 来源于胞内的钙库（图 29-10，见书后彩图）。

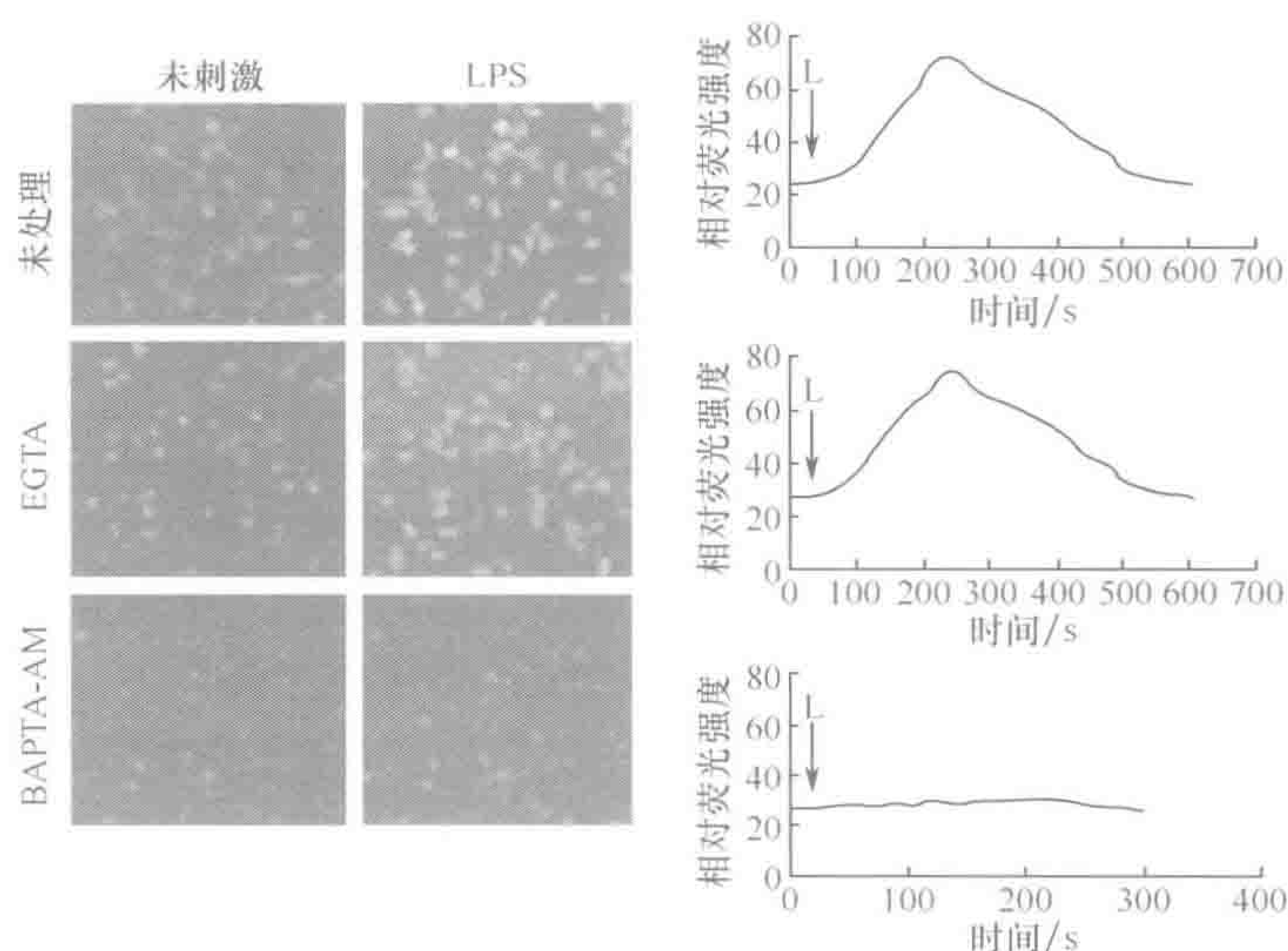


图 29-10　LPS 诱导小鼠巨噬细胞内钙上调

总之，由于激光扫描共聚焦显微镜同时具有高分辨率、高灵敏度、高放大率等特点，能够实时、定性、定量、定位地观察细胞或组织内部的微细结构，通过紫外光或可见光激发荧光探针而得到荧光图像，利用强大的计算机图像处理技术将观察到的细胞或组织结构分层扫描图像后进行分析或三维重建。此外，利用激光扫描共聚焦显微镜还可以测量细胞间通讯和细胞膜的流动性，进行细胞显微手术和细胞筛选等。随着激光扫描共聚焦显微镜的应用日益广泛，它在生物医学和生命科学领域发挥的作用也越来越重要。

（郑媛媛）

参 考 文 献

傅占江. 2007. Alpha-黑素细胞刺激素调节 T 细胞活化的分子机制. 第二军医大学博士论文.

黄晓峰，张远强，张英起. 2004. 荧光探针技术. 北京：人民军医出版社. 409～412.

李楠，王凤翔，周春喜. 1998. 荧光探针应用技术. 北京：军事医学科学出版社. 127～133.

王春梅，黄晓峰，杨勇骥，等. 2004. 激光扫描共聚焦显微镜技术. 西安：第四军医大学出版社.

杨勇骥. 2003. 实用生物医学电子显微镜技术. 上海：第二军医大学出版社. 31～35.

周庚寅. 2006. 组织病理学技术. 北京：北京大学医学出版社. 322～348.

Harnett MM. 2007. Laser scanning cytometry: understanding the immune system *in situ*. Nat Rev Immunol, 7 (11), 897～904.

Li N, Zheng YY, Chen W, et al. 2007. Adaptor protein LAPF recruits phosphorylated p53 to lysosomes and triggers lysosomal destabilization in apoptosis. Cancer Res, 67 (23): 11176～11185.

Liu XG, Yao M, Li N, et al. 2008. CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages. Blood, 112 (13): 4961～4970.

Paddock S. 2008. Over the rainbow: 25 years of confocal imaging. Biotechniques, 44 (5): 643～644, 646, 648.

Smith CL. 2001. Basic confocal microscopy. Curr Protoc Neurosci, Chapter 2: Unit 2.2.6.

第三十章　自身免疫病和类症性疾病动物模型

第一节　概　　述

动物模型的建立是为了更好地研究人类疾病，但动物模型又不能完全模拟人类疾病过程，因此动物模型的建立一定要进行周密设计。复制模型时必须从研究目的出发，充分了解所需动物模型的全部信息，如诱发条件、宿主特征、疾病表现和发病机理，分析是否能得到预期结果。因此，在建立动物模型过程中要遵循以下设计原则和注意事项。

一、实验动物设计原则

（一）相似性

设计动物疾病模型的一个重要原则是，所复制的模型应尽可能近似于人类疾病的情况，即能够可靠地反映某种机能、代谢、结构的变化，具备该种疾病的主要症状和体征，经实验室检查或病理切片等证实。例如，大白鼠原发性高血压就是研究人类原发性高血压的理想模型；狗自发性类风湿性关节炎与人类幼年型类风湿性关节炎十分相似，也是一种理想模型。

（二）重复性

为了增强动物模型复制时的重复性，必须在动物品种、品系、年龄、性别、体重、健康状况、饲养管理；实验及环境条件、季节、昼夜节律、应激、室温、湿度、气压、消毒灭菌；实验方法步骤；药品生产厂家、批号、纯度规格、给药剂型、剂量、途径、方法；麻醉、镇静、镇痛等用药情况；仪器型号、灵敏度、精确度；实验者操作技术熟练程度等方面保持一致。

（三）易行性和经济性

在复制动物模型时，所采用的方法应尽量做到经济并容易执行。灵长类动物如猕猴、猩猩、长臂猿与人最近似，复制的疾病模型相似性好，但稀少昂贵，不可多得。而很多小动物如大鼠、小鼠、地鼠、豚鼠等也可以复制出十分近似的人类疾病模型。它们遗传背景明确，体内微生物可控制，年龄、性别、体重等可任意选择，而且价廉易得、便于饲养管理，因此应用广泛。

二、实验动物设计注意事项

（一）动物的选择

为了确保所复制动物疾病模型与人类疾病的相似性，应尽量选用各种敏感动物，同时应首选一般饲养员较熟悉而便于饲养的动物作研究对象。动物模型应适用于多数研究者使用，容易复制，实验中便于操作和采集标本。但也不能盲目使用近交系动物，不然会导致不能控制的因素进入实验。例如，自发性糖尿病大鼠除具有糖尿病临床特征外，还发现多种病理变化，如外周神经系统严重病变、睾丸萎缩、甲状腺炎、胃溃疡、恶性淋巴瘤等，因此要有目的地选择。

（二）环境因素的影响

复制模型的成败往往与环境的改变有密切关系。一般小鼠、大鼠、豚鼠的模型建立要在 SPF 环境中进行，环境清洁水平、拥挤程度、饮食改变、过度光照、噪声影响等，任何一项被忽视都可能给模型动物带来严重影响。由于炎症性肠病的发生与肠道菌群有密切关系，因此普通环境下不容易诱导出炎症性肠病。除此以外，复制过程中固定、出血、麻醉、手术、药物和并发症等处理不当，同样会产生难以估量的后果。因此，要求尽可能使模型动物处于最小的变动和最少的干扰之中。

（三）动物疾病模型的评估

没有一种动物模型能完全复制人类疾病的真实情况。模型实验只是一种间接性研究，只可能在一个或几个方面与人类疾病相似。因此，模型实验结论的正确性只是相对的，最终必须在人身上得到验证。复制过程中一旦出现与人类疾病不同的情况，必须分析原因、影响因素和影响程度，正确评估哪些是有价值的。

第二节　自身免疫性脑脊髓炎

本节叙述诱导器官特异性和系统性自身免疫性疾病模型的实验方案。许多诱导器官特异性自身免疫性疾病的实验方案都包括给动物注射一种适当的抗原。例如，诱导小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎（experimental autoimmune encephalomyelitis，EAE），可作为人类最常见的脑和脊髓脱髓鞘疾病——多发性硬化症（multiple sclerosis，MS）的动物模型。

中枢神经系统（CNS）自身免疫性脱髓鞘疾病的发生是由于机体的免疫系统对 CNS 髓鞘和少突胶质细胞的自身免疫性攻击，可由病毒或其他的微生物触发。这种自身免疫反应的理论已在具有类似临床和组织学改变的各种动物模型上得到支持。例如，实验性自身反应性脑脊髓炎（EAE）是人类多发性硬化症（multiple sclerosis，MS）的动物模型。某些髓鞘抗原如髓鞘碱性蛋白（MBP）、蛋白脂蛋白（PLP）和寡树突胶质细胞糖蛋白（MOG）等均可以诱发 EAE。MS 与 EAE 相似的病理特征是均与血-脑屏障（BBB）的功能障碍有关，并伴随白质内单个核细胞的浸润，包括少量的自身反应性 T 细胞。这些炎

症细胞出现在脱髓鞘区域、神经元缺失及严重胶质瘢痕处。现已明确，自身反应性T细胞是该疾病具有器官特异性特征的原因，它们引发了促炎性细胞因子和调节因素的动态级联反应，最终产生了髓鞘毒性微环境并导致神经元的破坏。这些损害的发展导致脱髓鞘蔓延和神经元缺失，从而削弱了神经传递功能并产生一系列的临床症状。

不同的鼠类对EAE的易感性不同，Lewis大鼠对EAE非常易感，SJL/J、SWR/J种和昆明小鼠对EAE也很易感，而Bow-Norway大鼠、Balb/c小鼠对EAE有较高的抵抗性。用鼠作为研究对象的优点在于其遗传背景清楚、繁殖快、诱导EAE发生率和复发率高；且EAE在临床、病理和免疫生化改变等方面与人类MS较为相似，故较为常用。

一、应用PLP和MBP蛋白或多肽诱导主动性EAE

材料与试剂

雌性SJL小鼠，5～8周龄（Jackson Lab）

2mg/ml神经源性抗原（表30-1；Sigma）：MBP、PLP或相应的免疫决定簇表位多肽（如$PLP_{139-151}$、$PLP_{178-191}$或MBP_{84-104}）或MOG_{35-55}

不完全弗氏佐剂（IFA；Difco）

结核分枝杆菌H37Ra（灭活并烘干；Difco）

百日咳毒素（List Biologicals）

13ml聚苯乙烯试管

表30-1　在各种近交系小鼠中MBP、PLP和MOG致脑炎肽

小鼠种类	*H-2*型	肽[a]	序列[a]
SJL	$H\text{-}2^s$	MBP_{89-101}	VHFFKNIVTPRTP
		MBP_{84-104}	VHFFKNIVTPRTPPPSQGKGR
		$PLP_{139-151}$[b]	HSLGKWLGHPDKF
		$PLP_{104-117}$	KTTICGKGLSATVT
		$PLP_{178-191}$	NTWTTCQSIAFPSK
		PLP_{57-70}	YEYLINVIHAFQYV
		MOG_{92-106}	DEGGYTCFFRDHSYQ
PL/J，B10. PL	$H\text{-}2^u$	MBP_{Ac1-11}	Ac-ASQKRPSQRHG
		MBP_{35-47}	TGILDSIGRFFSG
		PLP_{43-64}	EKLIETYFSKNYQDYEYLINVI
(PL/J ×SJL)F1	$H\text{-}2^{s/u}$	MBP_{Ac1-11}	Ac-ASQKRPSQRHG
		PLP_{43-64}	EKLIETYFSKNYQDYEYLINVI)
		$PLP_{139-151}$[b]	HSLGKWLGHPDKF
C3H	$H\text{-}2^k$	$PLP_{103-116}$	YKTTICGKGLSATV
C57BL/6	$H\text{-}2^b$	MOG_{35-55}	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK
NOR/LtJ	$H\text{-}2^g$	MOG_{35-55}	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK
SWR	$H\text{-}2^q$	$PLP_{215-232}$	PGKVCGSNLLSICKTAEF

a. MBP肽序列是基于不同种类的MBP变体，具有数目不等的氨基酸残基；PLP肽序列来源于小鼠。

b. $PLP_{139-151}$序列140位丝氨酸(S)替换为半胱氨酸(C)以增加可溶性。

18G 和 25G 注射器针头（becton dickinson）

1ml 带双头同步注射针座连接器（Leur-lok 塞）的玻璃注射器（如 VWR）

步骤

1）将 40mg 结核分枝杆菌 H37Ra（4mg/ml）与 10ml IFA 混合制备成完全弗氏佐剂（CFA）。

2）将 1ml 神经源性抗原（2mg/ml）与 1ml CFA 混合，用玻璃注射器反复乳化上述混合物后置于 13ml 聚苯乙烯试管内（也可用超声方法制备乳化剂）。

3）用 18G 注射器针头抽取乳化剂至 1ml 注射器内，然后用 25G 注射器针头进行免疫。

4）剃去 SJL 小鼠背部毛发，在去除毛发的区域分三点（每处约 0.033ml）皮下注射 0.1ml 乳化抗原，其中一处沿两肩之间的背部中线，另外两处在下背部的中线两侧。

5）如用 MBP 或 $MBP_{84\text{-}104}$ 免疫时，还需在免疫的当天及免疫第 3 天经腹腔注射（i. p. ）或静脉注射（i. v. ）400ng 百日咳毒素。

6）每天监测并记录小鼠临床症状的发生情况（表 30-2、表 30-3 和表 30-4），这些症状在免疫后 14～28d 期间比较明显。

表 30-2 EAE 临床评分方法

评分	临床症状	评分	临床症状
0	正常小鼠	3	[c]后肢偏瘫
1	[a]尾无力或[b]后肢无力	4	[d]后肢完全瘫痪
2	[a]尾无力和[b]后肢无力	5	濒死状态；死于 EAE

a. 尾无力：举起小鼠时尾巴尖部不能卷曲。

b. 后肢无力：观察到鸭步态，步行时小鼠后肢从笼子罩的铁丝网漏下。

c. 后肢偏瘫：小鼠不再能用后肢维持臀部的姿势或行走，但是仍能在某种程度上移动一侧或两侧肢体。

d. 后肢完全瘫痪：小鼠后肢完全失去移动能力仅能用前肢拖动躯体。

表 30-3 疾病临床分期

分期	定义
急性期	疾病第一次发作
缓解期	临床症状改善期：急性期达到高峰后或处于疾病的复发期且临床评分下降至少 2d
复发期	缓解期后至少 2d 且临床评分至少增加 1 级

表 30-4 临床资料参数

临床资料	参数定义
平均临床评分	一组实验动物在起始发病后某一时间的平均临床评分
发病百分率	出现急性和(或)复发性临床症状的小鼠数目除以实验组中所有动物的总数
平均起始发病或复发时间	第一次出现急性和(或)复发性临床症状的平均天数
平均高峰期疾病严重性	一组出现临床症状的实验小鼠中达到平均最大临床评分

注意事项

根据所选择的抗原/抗原肽的不同以及小鼠的来源和年龄的差别，需要通过预试验来确定成功诱导 EAE 所需神经源性抗原和结核分枝杆菌的最低剂量。作为指导剂量，用 50nmol（80μg）$PLP_{139\text{-}151}$+CFA（含终浓度为 2mg/ml 的结核分枝杆菌）的乳化剂，给每只 SJL 小鼠单次免疫，足以诱导 80%～90%的小鼠发生严重的 EAE。应用 $MBP_{84\text{-}104}$ 诱导主动性 EAE，需要 100nmol $MBP_{84\text{-}104}$ 免疫 2 次，中间间隔一周。应用 MBP 或 PLP 全蛋白诱导主动性 EAE，所需剂量 50～100μg，单次免疫即可成功。

二、回输 MBP 或 PLP 特异性淋巴细胞诱导被动性 EAE

材料与试剂

雌性 SJL 小鼠，5～8 周龄（Jackson Lab）
MBP（或 $MBP_{84\text{-}104}$）、PLP（如 $PLP_{139\text{-}151}$，$PLP_{178\text{-}191}$）或 $MOG_{35\text{-}55}$
不完全弗氏佐剂（IFA；Difco）
结核分枝杆菌 H37Ra（灭活并烘干；Difco）
百日咳毒素（List Biologicals）
13ml 聚苯乙烯试管
18G 和 25G 注射器针头（Becton Dickinson）
BSS 缓冲液
完全 DMEM-5 培养基
37℃，7.5%CO_2 孵箱
100 目不锈钢网
50ml 锥形聚苯乙烯离心管

步骤

1）用 MBP 或 PLP 免疫 SJL 小鼠，免疫 7～10d 后，处死小鼠并取出淋巴结（腹股沟、腘窝、腋窝）。将这些淋巴结置于 BSS 缓冲液中。
2）用注射器针芯挤压淋巴结，通过 100 目不锈钢网制备成单个细胞悬液。用 BSS 缓冲液冲洗钢网收集单细胞悬液，离心收集细胞沉淀。
3）将细胞置于含 50μg/ml 神经源性抗原的 DMEM-5 培养基的培养瓶中，调整细胞浓度为 6×10^6 个/ml，37℃、7.5%CO_2 孵箱中孵育 72h。300g 离心 15min，再用 BSS 缓冲液洗涤，计数细胞并用台盼蓝拒染实验确定细胞的活力后，用 BSS 缓冲液调整细胞 2×10^7 个/ml，为神经源性抗原致敏的淋巴细胞。
4）给正常 SJL 受鼠 i. p. 或 i. v. 1×10^7 神经源性抗原致敏的淋巴细胞，监测 EAE 的发生。

注意事项

1）神经源性抗原致敏的淋巴结细胞体外再次活化时需要相同批次的蛋白质或合成肽，且需合适的抗原浓度。
2）也可用 Con A 来再次刺激引流淋巴结细胞增殖。Con A 活化刺激细胞增殖将会

减少神经源性抗原特异性细胞的丰度，但为了获得可靠且严重的 EAE 需要注射较大量细胞时，应通过预实验或经验来确定 Con A 刺激细胞增殖的数量。

第三节 自身免疫性甲状腺炎模型

自身免疫性甲状腺炎是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病，其病理特征是甲状腺实质组织广泛破坏、萎缩，甲状腺组织内淋巴细胞和单核细胞浸润，甚至淋巴小结形成。实验性自身免疫性甲状腺炎（experimental autoimmune thyroiditis，EAT）动物模型是研究自身免疫性甲状腺炎的重要工具。目前已经建立的 EAT 模型可分为免疫方法诱导产生的 EAT、高碘诱发的 EAT 以及自发产生的 EAT 模型等几类。

一、免疫法诱导自身免疫性甲状腺炎

（一）甲状腺球蛋白诱导 EAT

利用甲状腺特有的自身抗原成分，如甲状腺球蛋白（thyroglobulin，TG）、甲状腺过氧化物酶（thyroid peroxidase，TPO）、促甲状腺激素受体（thyrotropin receptor，TSHR）、甲状腺激素（thyroid hormone；T3、T4）、甲状腺细胞膜及甲状腺胶质等，均可不同程度地诱发 EAT。自身甲状腺组织提取的甲状腺球蛋白作为抗原诱导 EAT 是最常用的模型，此外其他多种抗原成分都可以诱导 EAT。TPO 是参与甲状腺激素合成的关键酶，是微粒体抗原的主要成分。TPO 抗原含有 7 个表位，包括Ⅰ(65-108)、Ⅱ(106-126)、Ⅲ(233-331)、Ⅳ(467-515)、Ⅴ(574-621)、Ⅵ(641-685)和Ⅶ(701-730)，其中Ⅲ和Ⅳ表位是 EAT 最常识别的表位。另外，TSH 受体（TSHR）也可诱导 EAT 模型，如细菌产生的 TSHR 胞外区-麦芽糖结合蛋白（ECD-MBP）融合蛋白，免疫 BALB/c 小鼠后也可以诱导 EAT。本部分主要介绍自身甲状腺组织提取的甲状腺球蛋白作为抗原诱导 EAT。

用甲状腺球蛋白作为抗原诱导小鼠产生抗甲状腺球蛋白的自身抗体，从而导致小鼠发生 EAT，是目前较常用的动物模型。取小鼠自身的甲状腺组织，研磨，提取纯化的甲状腺球蛋白，在体外与免疫佐剂混合制成乳化抗原后免疫小鼠，使小鼠产生自身抗体，破坏正常的甲状腺组织，因而发病。不同种类的小鼠对甲状腺球蛋白诱导模型易感性不同，其中 $H-2^k$（CBA/J，C57BR，B10.K，B10.BR）和 $H-2^s$（SJL，B10.S）型反应最强，$H-2^q$（B10.Q）和 $H-2^a$ 型次之，$H-2^b$（C57BL/10，C57BL/6）和 $H-2^d$（BALB/c，B10.D2）型反应较差，$H-2^v$ 型小鼠为最差（k、s、q、b、d，分别代表小鼠不同的遗传基因型）。此外，诱导的 EAT 特征因为佐剂应用的不同而异，使用完全弗氏佐剂（CFA）诱发的 EAT 特征是肉芽肿性损害伴显著的滤泡结构破坏，而使用脂多糖作为免疫佐剂诱发的 EAT 仅仅有局部的单核细胞浸润。

材料与试剂

小鼠

生理盐水

组织匀浆器
低温离心机
透析装置
Sephadex G-200
聚乙二醇（PEG）
10%（体积比）福尔马林
ELISA 检测试剂盒

步骤

1）颈椎脱臼法处死小鼠，取出喉和气管之间的甲状腺，去除结缔组织，提取时将甲状腺组织用预冷的生理盐水冲洗，切成 1mm 厚的碎片。

2）加入适量的生理盐水，在冰浴中用组织匀浆器研磨，并将匀浆液转移至超速离心管内，4℃，100 000g（35 000r/min，SW50.1 转子）超速离心 1h，沉淀物弃去。

3）Sephadex G-200 用生理盐水充分溶胀，装柱，用生理盐水平衡柱床，将甲状腺组织滤液上样，用生理盐水洗脱（流速 1.5ml/min，温度 4℃），收集 2～3ml 成分液。

4）紫外分光光度计测定 OD 值得到精确浓度，分装冷冻干燥后－20℃冰箱保存，一般 300～500 只小鼠可以得到 30～60mg 纯化的甲状腺球蛋白。

5）将纯化的甲状腺球蛋白（mTG）与完全弗氏佐剂（CFA）1∶1 混合制成乳化抗原，快速将溶剂通过金属连接器推进装有 CFA 的注射器中，将这些溶剂在两个注射器之间快速反复推抽约 5min，直到水溶液完全被油滴吸附，乳化剂变得稠密以致将注射器保持直立时乳化剂中的小气泡不移动。分别于第 0 天和第 7 天，分两次皮下注射，第一次在尾部皮下多点注射，第二次在足底皮下多点注射，每只小鼠每次注射 500μg/ml 的 mTG 0.1ml，至步骤 8）。

6）分别于第 0 天和第 7 天，经尾静脉注射 500μg/ml 的 mTG 0.1ml，3h 后注射 200μg/ml 的 LPS 0.1ml，至步骤 8）。

7）步骤 5）和 6）两步任选一种。

8）检测 EAT 发生。

（1）自身抗体水平：免疫后第 14 天和处死前收集 0.5ml 免疫血清用 ELISA 检测抗甲状腺球蛋白自身抗体水平。除抗 TG 抗体，在 EAT 模型中，抗 TPO 抗体和抗 TSHR 抗体也都会升高。

（2）甲状腺激素 T4 水平：不同时间点取小鼠免疫血清，检测甲状腺激素 T4 水平。

（3）病理检查：第 28 天处死小鼠，取甲状腺小叶，用 10%福尔马林固定，石蜡包埋并行苏木精-伊红（HE）染色，显微镜下观察单个核细胞浸润和甲状腺滤泡受破坏程度。

病理评分：1+：一个或多个滤泡至少有 125 个细胞浸润；
　　2+：组成腺体约 25%的甲状腺滤泡（10～20 个）有淋巴细胞浸润；

3＋：组成腺体25％～50％的甲状腺滤泡有淋巴细胞浸润；

4＋：组成腺体＞50％的甲状腺滤泡有淋巴细胞浸润；

5＋：腺体完全被破坏基本不剩或只剩几个甲状腺滤泡 。

（二）致敏淋巴细胞诱导EAT

用抗原如mTG等免疫（用LPS作为免疫佐剂）CBA/J或者DBA/J小鼠，分离被免疫小鼠的脾细胞，在体外用含有该抗原（mTG）的培养基培养使淋巴细胞致敏，将致敏的淋巴细胞直接回输给同型小鼠就能诱导针对TG抗原的免疫反应导致EAT的发生。该方法与抗原直接诱导EAT相比，甲状腺中淋巴细胞浸润程度更加严重。此法诱导的EAT模型以甲状腺组织肉芽肿的形成为特征，又称肉芽肿性实验性自身免疫性甲状腺炎（granulomatous experimental autoimmune thyroiditis，G-EAT）。

材料与试剂

CBA/J（H-2^k）小鼠

mTG

LPS

100目不锈钢网

步骤

1）150μg mTG和15μg LPS混合后静脉注射CBA/J小鼠，间隔10d同样的量再注射一次。

2）第二次注射mTG和LPS后5～7d，取小鼠脾脏细胞，轻柔研磨后，通过100目不锈钢网，制备成单个细胞悬液。

3）用含25μg/ml的mTG、5ng/ml的IL-12、5％的抗IL-2受体的单克隆抗体M7/20、5％胎牛血清的完全RPMI1640培养基调整细胞浓度至1×10^7个/ml。

4）72h后收集细胞，PBS洗一遍，过继回输给600 Rad辐照过的CBA/J小鼠（一般3.5×10^7～4×10^7mTG处理的CBA/J小鼠来源的脾脏细胞回输给辐照后的CBA/J小鼠可以诱导非常严重的G-EAT）。

5）在回输后19～21d，模型鼠会发生非常严重的G-EAT，一般在此期间取小鼠甲状腺组织进行病理检查，但如果要对模型鼠进行代谢实验，一般在回输后7～60d这一时间段监测相关指标。

（三）核酸诱导EAT

随着基因组学的高速发展，核酸免疫已经越来越多地受到人们的关注，也开始应用于动物模型的建立。人TSHR（hTSHR）基因（含有hTSHR-cDNA片段的质粒）肌内注射后被肌细胞表达，由于细胞毒反应，使肌细胞崩解，hTSHR多肽释放，并作为特异性抗原提呈于专业抗原提呈细胞（APC）——树突状细胞，从而激活TSHR敏感的T细胞，继而引发甲状腺炎。为了增加模型的成功率，一般在核酸注射之前用辛酸甘油酯预处理小鼠，作用是招募更多的APC，特别是树突状细胞。

材料与试剂

人 TSHR 的 cDNA 片段
pcDNA 3 表达质粒
BALB/c 小鼠（6 周龄）
辛酸甘油酯

步骤

1）将编码人 TSHR 的 cDNA 片段插入 pcDNA 3 质粒，构建 hTSHR 的真核表达质粒 pcDNA 3-hTSHR。
2）第 0 天胫前肌内注射辛酸甘油酯（心脏毒素）预处理小鼠，招募 APC 至注射部位。
3）100μg pcDNA 3-hTSHR 溶于 PBS 中，分别于第 5 天、第 21 天（第 3 周）、第 42 天（第 6 周）胫前肌内注射免疫 BALB/c 小鼠，对照组使用 100μg pcDNA 3 表达质粒。
4）第 13 周后用 ELISA 方法检测抗人 TSHR 抗体，并监测 EAT 的发生。

二、高碘诱导自身免疫性甲状腺炎

碘是自身免疫性甲状腺炎发病的主要环境因素之一，随着碘摄入量的增加，甲状腺内淋巴细胞浸润程度逐渐加重。高碘可以通过多种途径诱导 EAT。首先高碘对甲状腺细胞具有直接损伤作用；此外碘可以与 TG 结合生成碘化 TG，碘化 TG 具有更强的免疫原性，有利于抗原肽的提呈，诱导更多的效应性 T 细胞。另外，碘诱使 MHC-Ⅱ抗原异常表达，增强了吞噬细胞的功能及免疫细胞的攻击性。另外，碘可以促进免疫细胞产生某些细胞因子如肿瘤坏死因子等，促进了自身免疫的发生。通常在饮水中加入 0.05%碘饲养 EAT 易感小鼠 60～90d，就能诱导 EAT 发生。高碘诱发 EAT 也用于研究碘与 EAT 的关系。

三、自发性自身免疫性甲状腺炎

BB 大鼠、Buffalo 大鼠及 NOD 小鼠，这些动物的 MHC 对 EAT 的发生有非常重要的影响，它们都能自发的产生甲状腺炎。

OS 鸡模型自发 EAT 的机制在于 TG 抗体可以通过蛋黄转入鸡胚和新孵小鸡体内，这些抗体能介导抗体依赖细胞介导的细胞毒作用（ADCC），作用于甲状腺细胞，继而导致 EAT。

第四节 系统性红斑狼疮动物模型

系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus，SLE）是一种病因未明的自身免疫病，皮肤、关节、肾脏、中枢神经系统以及其他部位的炎性损害是人类系统性红斑狼疮的特征。临床表现伴随着多种针对主要而非绝对地来源于细胞核的自身抗原的抗体。尽管由细胞介导的免疫的直接损伤也是非常重要的，普遍认为是自身抗体导致了大部分的组织损害。

血清中出现多种自身抗体和免疫复合物（immune complex，IC），伴随严重肾小球肾炎。目前系统性红斑狼疮的小鼠模型主要分为自发型小鼠模型、人工诱导型小鼠模型和基因调控小鼠模型。自发型 SLE 小鼠模型具有明确的遗传背景和良好的遗传稳定性，在研究遗传因素对 SLE 的影响中具有重要意义。New Zealand 小鼠包括 NZB（new zealand black）和 NZW（new zealand white）两个品系。NZB 和 NZW 的杂交一代（NZB/NZW F_1）能发生严重的自身免疫病，而其亲代任一方都不发生自身免疫病。NZB/NZW F_1 中雌性比雄性鼠发病早，与人类 SLE 的发病相似，因此该小鼠被当作人类 SLE 的一个经典小鼠模型。NZB/W F_1 小鼠在 6 个月时肾中出现免疫球蛋白和补体 C3，在 6～12 个月时死于晚期肾功能衰竭。MRL/lp r 小鼠和 BXSB 小鼠 SLE 模型，其中 MRL/lp r 小鼠由于 lp r 基因的突变使 Fas 抗原表达缺陷，导致 B 细胞不能自然凋亡，从而引起 SLE（Ichii，2008）。BXSB 小鼠由雌性 C57BL/6 和雄性 SB/Le 杂交而能自发地出现 SLE 样的自身免疫综合征，其血清学特点类似于 NZB/W F_1，出现高水平的抗 DNA 和染色体自身抗体。Renaudineau 等（2007）发现在 SLE 小鼠体内存在抗ds DNA 和抗 α-肌动蛋白单克隆抗体，它们可与肾脏上的 α-肌动蛋白结合引起肾炎。

人工诱导型小鼠模型适合于短期的研究，Izuis（1977）报道：将 LPS 在使用前用生理盐水配制成 0.25g/L 浓度，分别给予小鼠腹腔注射 2.5mg/kg 造模。Satoh（1994）等应用 0.5ml Pristane 腹腔注射 Balb/c 小鼠后 1～2 周，血清中 IgM 型抗 ss DNA 和组蛋白自身抗体出现，至 1 个月达峰值，以后逐渐下降，于 2 个月左右达正常水平；6 个月时尿蛋白水平多达（3～10g/L），其间动物有体重明显下降的阶段，并有脱毛及腹水等现象。大部分小鼠在诱发 SLE 后 5 个月左右死亡。

基因调控小鼠包括转基因小鼠和基因敲除小鼠（Bendiksen，2008）。目前转基因和基因敲除技术在国内还未发展为一种常用技术，但受到越来越多的重视。

上面提及的所有 SLE 模型都能够产生针对染色质和 ssDNA 的抗体。SLE 小鼠血清学最显著的特点是存在大量的自身抗体，包括抗核抗体（如抗 ssDNA、dsDNA、组蛋白、Sm、Ro/SSA、La/SSB、snRNP 抗体等）和抗磷脂抗体。其中抗 dsDNA 抗体仅见于 NZB/NZW、NZB/SWR 及 MRL/lpr 小鼠，类风湿因子可见于 MRL/lpr 和 B6/lpr 小鼠。除了这些血清学指标外，蛋白尿、肾脏组织学以及死亡率都是该疾病非常有用的标志。

第五节　胶原诱导性关节炎

应用Ⅱ型胶原（CⅡ）免疫啮齿动物和非人灵长类动物的易感种类可诱发胶原诱导性关节炎（CIA）。免疫后这些动物出现自身免疫介导的多关节炎，在许多临床表现、组织学和免疫学方面与人类类风湿关节炎相类似。

一、小鼠胶原诱导性关节炎

材料与试剂

DBA/1JLacJ 小鼠（Jackson Labs）

鸡或牛CⅡ：α1（Ⅱ）链或CⅡ的CB11片段（Sigma或Chondrex公司）
10mmol/L乙酸，0.2μm滤膜过滤除菌
不完全弗氏佐剂（IFA；Difco）
结核分枝杆菌（H37R；加热灭活）
研钵和研杵
高速匀浆器
1ml玻璃注射器，26G注射器针头

步骤

1）将CⅡ溶于10mmol/L乙酸中，配制浓度为4mg/ml的CⅡ，4℃振摇过夜（需冷藏保存）。
2）制备CFA：用研杵在研钵内研磨灭活的结核分枝杆菌和IFA混合物（结核分枝杆菌的终浓度为4mg/ml）。
3）用高速匀浆器或乳化技术，在免疫前将CⅡ与等体积的CFA制成乳化剂。使用带有26G针头的1ml玻璃注射器小鼠尾部皮下注射0.1ml（含有100μg结核分枝杆菌和100μg CⅡ）。
4）评定关节炎的进展情况并且检测T细胞对CⅡ应答情况。

注意事项

1）胶原在乳化制备过程应冷藏。
2）使用α1（Ⅱ）链或CB11片段来诱导关节炎时，在初次免疫2～3周后需用50μg CⅡ和IFA的乳化剂再次免疫。
3）DBA/1JLacJ小鼠应用CⅡ免疫诱导关节炎，典型的表现出现于免疫后3～5周，疾病的高峰期在第6周出现。关节炎是单相病程，其最终转归或者是为表现正常的肢体或者更为常见的是出现一只严重关节强直的手爪。前爪、后爪或前后爪都可发生关节炎，疾病高峰期会累及从踝到脚趾的整个爪。尽管关节炎早期症状难以检测，但是在疾病完全发作时，即使是未经训练的观察者都可以容易的鉴定疾病。
4）CFA是极强的致炎剂，特别是皮下注射或进入眼睛内能够引起较深的皮肤腐烂或视力缺失，在操作CFA时应当戴手套及眼睛防护罩。

二、小鼠关节炎的评定

在啮齿动物CIA模型中，动物的四个爪子均可被累及。在疾病的高峰期炎症可以从踝部扩展至趾端，其典型特征是肿胀和充血。一旦出现关节炎，每周检查爪子2～3次。描述关节炎严重程度最常用的方法是一种简单的可视性0～4分的评分系统（表30-5），其中1分表示较轻微的炎症，而4分则表示整个爪子出现广泛的肿胀和充血。将小鼠置于易于被检查爪子的体位，从踝部至趾端仔细检查每一个爪子并按照表30-5给出不同的病理评分，每周重复2～3次。但应避免对动物过度的处理以影响疾病的严重程度和关节炎的发病率。为了有助于减少评定的主观性并避免偏见，需要两个独立的观

察者来进行检查。

表 30-5　CIA 啮齿动物模型关节炎严重程度视觉评分系统

严重度评分	视觉病理
0	无红斑和肿胀的证据
1	红斑和轻度肿胀局限于足中段(跗骨)或踝关节
2	红斑和轻度肿胀从踝关节蔓延至足中段
3	红斑和中度肿胀从踝关节蔓延至跖关节
4	红斑和重度肿胀包括了踝、足和趾

材料

恒压测径器

步骤

1）将小鼠置于易于被检查爪子的体位。在踝部（内侧或外侧）放置恒压测径器并测量厚度最小值。为精确起见应测量 2 次。

2）重复上述操作测量同一只爪子跗骨的踝部（腹侧或背侧）。

3）重复测量每一只爪子。

大鼠佐剂性关节炎

佐剂性关节炎为一种诱导性的慢性关节炎，被用于研究人类类风湿关节炎和其他关节炎或炎症性疾病。

材料与试剂

Lewis 大鼠，6～12 周龄，无病原菌级

10mg/ml 热灭活结核分枝杆菌（H37Ra 型）混悬于不完全弗氏佐剂（IFA）

1ml 玻璃注射器，20G 和 25G 注射器针头

标尺卡尺

湿棉球

步骤

1）将灭活的结核分枝杆菌与 CFA 均匀混合后，用 20G 针头吸入 1ml 玻璃注射器内。

2）称量 6～12 周龄 Lewis 大鼠的体重，将大鼠放置控制装置内或用乙醚或其他吸入剂麻醉后，检测双侧踝关节和腕关节的厚度，重复测量 3 次，取平均值作为免疫前的基础值（基线）。

3）更换注射器针头为 25G。给每只大鼠皮内注射 0.1ml 含结核分枝杆菌的混悬液。重复免疫 2 或 3 次。

4）免疫后第 10 天到第 25 天，每天通过肉眼观察来评定疾病的发生发展情况。评估步行能力、踝关节和腕关节以及小指（趾）间关节的皮肤红肿情况；并每天给大鼠称重以观察体重的变化。

应用以下的标准对四肢进行评分，关节炎指数最高为 16。

0＝无红斑或肿胀

1＝轻微的红斑或一个趾的肿胀

2＝红斑和超过一个趾的肿胀

3＝红斑和踝部或腕部肿胀

4＝全部红斑以及脚趾和踝部或手指和腕部的肿胀，踝或腕不能弯曲

5）25d 以后，在其后的两周内每 2～3d 对每只大鼠进行评分和称重。

第六节　炎症性肠病动物模型

炎症性肠病（inflammatory bowel disease，IBD）是一组反复发作的慢性非特异性肠道炎症性疾病，主要包括溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）和克隆氏病（Crohn's disease，CD）两个独立的疾病，二者在临床表现和病理特点上各不相同。由于其病因不明和发病机制不清，治疗上缺乏特异有效的药物，因此人们制作了多种动物模型对其进行研究。目前一般将 IBD 动物模型分为 4 类：①化学药物诱导型动物模型；② 细胞移植型动物模型；③ 基因型动物模型；④自发性动物模型。具体见表 30-6。

表 30-6　IBD 动物模型分类

模型	病变部位	病变特点
化学药物诱导型		
TNBS 动物模型	结肠	类似 CD
DSS 动物模型	结肠	类似 UC
OXZ 动物模型	结肠	类似 UC
二硝基氯苯动物模型	结肠	类似 UC
乙酸动物模型	结肠	类似 UC
角叉菜胶动物模型	结肠	类似 UC
吲哚美辛动物模型	结肠	类似 UC
细胞移植型		
$CD4^{+}CD45RB^{hi}$ 回输给 $Rag^{-/-}$ 小鼠	结肠	类似 CD/UC
基因型		
$IL\text{-}2^{-/-}$	结肠	类似 CD
$IL\text{-}2R\alpha^{-/-}$	结肠	类似 UC
$IL\text{-}10^{-/-}$	小肠/结肠	类似 CD/UC
$TGF\text{-}\beta^{-/-}$	结肠	类似 UC
$G\alpha i2^{-/-}$	结肠	类似 UC
$TCR\alpha^{-/-}$	结肠	类似 UC
$TCR\beta^{-/-}$	结肠	类似 UC
$CRFB_4^{-/-}$	结肠	类似 UC
$TNF\text{-}\alpha ARE^{-/-}$	结肠	类似 CD
$Mdr1\alpha^{-/-}$	结肠	类似 CD
STAT4-转基因小鼠	结肠	类似 CD

续表

模型	病变部位	病变特点
IL-7-转基因小鼠	结肠	类似 UC
自发型		
绢毛猴	结肠	类似 UC
C3HeJ Beir 小鼠	结肠	类似 UC
SAMP1/Yit 小鼠	小肠	类似 CD

注：TNBS：三硝基苯磺酸；DSS：葡聚糖硫酸钠；OXZ： 唑酮；CD：克隆氏病；UC：溃疡性结肠炎。

一、化学药物诱导炎症性肠病模型

化学药物诱导的 IBD 动物模型因其制作简便、经济，在实际研究中被广泛采用。但是，这类动物模型不具备人类 IBD 病程缓解和复发交替出现的特征。目前用于诱导 IBD 动物模型的化学药物主要包括 2,4,6-三硝基苯磺酸（trinitrobenzene sulfonic acid，TNBS）、葡聚糖硫酸钠（dextran sodium sulfate，DSS）、 唑酮（oxazolone，OXZ）等，较早使用的乙酸目前应用较少。下面介绍几种常用模型。

（一）三硝基苯磺酸诱导 IBD

三硝基苯磺酸（TNBS）是一种有机酸半抗原。先用 TNBS 与丙酮和橄榄油的混合液预致敏小鼠局部皮肤，然后用克他命/甲苯噻嗪工作液麻醉小鼠，用 TNBS 溶于乙醇灌肠。乙醇作为有机溶剂溶解肠黏膜表面的黏液，破坏肠黏膜屏障，促进 TNBS 进入局部肠组织，TNBS 的三硝基苯基（TNP）残基与赖氨酸共价结合，形成经 TNP 修饰的结肠蛋白自身抗原，引发一系列机体免疫反应。此外，TNBS 可通过与抗坏血酸的相互作用，产生 H_2O 和 H_2O_2，介导细胞毒作用，共同导致肠道炎症的发生。TNBS 诱导的肠道炎症主要是 Th1 型免疫反应，从该模型小鼠结肠分离出的巨噬细胞能分泌大量 IL-12，分离的淋巴细胞产生大量 IFN-γ 和 IL-2，类似于人 CD。不同浓度的乙醇和 TNBS 产生不同程度的透壁性肠道炎症，现常用 50％乙醇。此外，与 SJL/J（$H\text{-}2^{s}$）和 BALB/c（$H\text{-}2^{d}$）小鼠相比，C57BL/6（$H\text{-}2^{b}$）小鼠对 TNBS 诱导结肠炎相对抵抗。可根据实验需要选择合适剂量的 TNBS（表 30-7，50～150mg/kg 体重）溶于 50％乙醇溶液，配置 TNBS 工作液。

表 30-7　TNBS 剂量与结肠炎的严重程度相关性

	轻度	中度	重度	极重
TNBS 剂量/(mg/kg 体重)	50～100	100～125	125～150	125～150
死亡率/%	0	0～10	0～20	20
体重减轻/%	0～10	5～15	10～20	20

TNBS 诱导肠道炎症比较慢，1 周后才达高峰，炎症持续存在，为全结肠、全层性炎症，偶见肉芽肿形成，体现以溃疡形成为主要表现的急性炎症向慢性炎症转化的过程。该模型具有制作简单，重复性好，费用低和病变时间长，慢性炎症突出等特点，在 IBD 实验研究中被广泛采用。另外，该模型组织学变化的许多特点与人类 CD 相似，如

节段性、跳跃性炎症和溃疡常见，可见肥大细胞和淋巴细胞浸润及隐窝变形，还可见巨噬细胞等，因此 TNBS 模型一直作为模拟人 CD 的动物模型。

材料与试剂

小鼠（每实验组至少 5 只，6～16 周龄，性别和年龄匹配）

5%（质量体积比）TNBS（用水配制）

无水乙醇

50%（体积比）乙醇（用去离子水配置）

克他命/甲苯噻嗪工作液：0.6ml 克他命（100mg/ml），0.4ml 甲苯噻嗪（20mg/ml），4ml PBS 缓冲液混合

TNBS 预致敏液：丙酮和橄榄油以 4∶1 的体积比混合并强力振荡。4 体积的丙酮/橄榄油混合液与 1 体积的 5%TNBS 混合获得 1%（质量体积比）TNBS，剧烈振荡混匀

TNBS 工作液：1 体积 5%TNBS 与 1 体积无水乙醇混匀

振荡器

剃刀

毛刷

3.5F 导尿管（直径 1.2mm 硅胶导管）或者钝头灌胃管，二选一

1ml 注射器

步骤

1）第 1 天，选取小鼠腹部区域（远离肩膀，避免小鼠舔到引起口服耐受）用剃刀小心刮除皮毛，暴露出 1.5cm×1.5cm 皮肤，注意不能刮破皮肤。

2）一手抓住小鼠，另一只手用 200μl 移液管吸取 150μl TNBS 预致敏液涂于刮过的腹部皮肤，溶液将被皮肤迅速吸收，阴性对照小鼠选用无 TNBS 的预致敏液。

3）第 8 天，称重并标记小鼠。

4）麻醉小鼠：腹腔注射 80μl 克他命/甲苯噻嗪液/10g 体重。

5）安装 3.5F 导尿管至容有 TNBS 工作液的 1ml 注射器。

6）将导尿管自肛门伸入距肛门 4cm 的结肠部位，注意动作要轻柔避免损伤肠壁。

7）缓慢注射 100μl TNBS 工作液至结肠腔。阴性对照：小鼠结肠灌注 50%乙醇；阳性对照：小鼠预先用 $NaHCO_3$ 灌胃，然后用 TNBS 工作液结肠灌注。

8）小心移除导尿管，并使小鼠保持头向下直立位 60s。

9）将小鼠放回鼠笼。

10）监测 IBD 发生。

临床症状改变：模型小鼠会出现厌食、少动、腹泻、大便隐血、黏液血便、便血、体重减轻等表现，可监测这些指标的变化计算 DAI 评分，DAI 评分＝体重减轻评分＋出血评分。

病理改变：该模型为慢性 IBD 的模型，一般 2 周后处死小鼠，取肠道组织进行病

理检查，根据炎性细胞浸润深度和肠上皮破坏程度计算组织学评分（HS 评分），HS 评分＝肠上皮损伤评分＋炎症细胞浸润评分。

体重减轻评分　0＝体重无变化；1＝体重减轻 5%～10%；2＝体重减轻 10%～15%；3＝体重减轻 15%～20%；4＝体重减轻超过 20%。

出血评分　0＝不出血；2＝隐血试纸检测隐血阳性；4＝大量肉眼血便。

肠上皮损伤评分　0＝正常；1＝黏膜肿胀，黏膜隐窝不规则，杯状细胞消失；2＝轻度至中度黏膜隐窝消失（10%～50%）；3＝黏膜隐窝完全消失，但上皮层完整；5＝小至中等大小溃疡形成（<10 个隐窝宽度）；6＝大溃疡形成（≥10 个隐窝宽度）。

炎症细胞浸润评分　黏膜：0＝正常，1＝轻到中度浸润，2＝严重浸润；黏膜下：0＝正常，1＝轻到中度浸润，2＝严重浸润；浆肌层：0＝正常，1＝中度到严重浸润。

（二）葡聚糖硫酸钠诱导 IBD

葡聚糖硫酸钠（dextran sodium sulfate，DSS）为人工合成的一种硫酸多糖，将 DSS 溶解于水中给小鼠或大鼠饮用可引起结肠炎。DSS 结肠炎的早期急性炎症反应与 DSS 影响 DNA 合成、抑制上皮细胞增生、破坏肠黏膜屏障、巨噬细胞功能障碍及肠道菌群失调等有关。DSS 所致炎症过程以引起 Th1/Th2 细胞功能失调为特征，慢性炎症期 IFN-γ、IL-4 水平升高。

此种模型操作简便，特异性高，重复性好，持续时间较长，其应用非常广泛。小鼠自由饮用 7d，随后饮水 10d，此为一个循环，可致急性结肠炎，多个循环可致慢性结肠炎，此外用致癌剂氧化偶氮甲烷（azoxymethane，AOM）预处理小鼠然后用 DSS 反复刺激可以诱导不典型增生和结肠炎相关的结肠癌。因此这种模型既可以应用于 UC 急性期又可以应用于慢性缓解期的研究，研究者可根据实验目的一个或几个周期后观察动物症状及肠道病变。但由于不能精确控制动物的饮水量，会导致制作出的模型病变差异较大。另外，不同种类的小鼠对 DSS 诱导的结肠炎的易感性不同，一般 C57 BL/6J 小鼠给予 1.5%质量体积比的 DSS，129/Sv 小鼠给予 4%质量体积比的 DSS，BALB/c 小鼠给予 3.5%的 DSS 可以诱导出相似严重程度的结肠炎，因此可以根据需要选择小鼠以及相应的 DSS 浓度。

材料与试剂

小鼠（每实验组至少 5 只，6～16 周龄，性别和年龄匹配。）

DSS 盐［分子质量：36～50kDa，MP Biomedicals］

高压灭菌饮用水

氧化偶氮甲烷（AOM）

去离子水

PBS 缓冲液

DSS 饮用水：17.5g DSS 溶于 500ml 高压灭菌饮用水获得 500ml 3.5% DSS 饮用水，4℃保存

AOM 工作液：去离子水溶解 AOM 获得 10mg/ml 储存液。分装后－20℃保存，避免反复冻融。使用前用 PBS 缓冲液 1∶10 稀释

步骤

1. 急性结肠炎

1）第 1 天称重并标记小鼠。

2）将 DSS 与高压灭菌水配制成 3.5%的 DSS 溶液，让 BALB/c 小鼠自由饮用，对照小鼠只引用蒸馏水（每只小鼠每天约喝 5ml DSS 溶液）。

3）第 3 天更换 DSS 溶液。

4）第 5 天再次更换 DSS 溶液。

5）第 8 天更换为高压灭菌水。

2. 慢性结肠炎

1）执行急性结肠炎操作步骤 1）～4）。

2）第 8 天更换为高压灭菌水自由饮用 14d。

3）在 22～26d，执行急性结肠炎操作步骤 2）～4）。

4）第 29 天更换为高压灭菌水自由饮用 14d。

5）在 43～47d，执行急性结肠炎操作步骤 2）～4）。

6）第 50 天更换为高压灭菌水。

3. 结肠炎相关的结肠癌

1）第 1 天称重并标记小鼠。

2）腹腔注射 10mg/kg 体重 AOM。

3）执行慢性结肠炎操作步骤 1）～6）。

4）除了监测 IBD 发生外，观察癌肿的发生。

（三）噁唑酮诱导 IBD

唑酮（OXZ）也是一种半抗原。先用 OXZ 与丙酮和橄榄油的混合液［60mg OXZ 溶于 2ml 丙酮/橄榄油混合液获得 3%（质量体积比）OXZ］预致敏小鼠局部皮肤，然后用克他命/甲苯噻嗪工作液麻醉小鼠，最后用 OXZ 溶于乙醇［20mg OXZ 溶于 2ml 50%乙醇获得 1%（质量体积比）OXZ］灌肠。OXZ 结肠炎为 Th2 型结肠炎，以 IL-4、IL-5 或 IL-13 升高，IFN-γ 正常为标志。该实验步骤与 TNBS 诱导 IBD 类似，可参考。

该模型操作简便，制作时间短，重复性好；缺点是疾病维持时间短，自愈性强，因此不能模拟 IBD 慢性期变化，在 IBD 试验研究中的应用不如前两者常用。但此模型的组织学特征、部位和细胞因子增殖情况均与人 UC 十分相似，因此主要被作为 UC 的动物模型，适用于 UC 病因和发病机制的研究及筛选对 UC 可能具有治疗潜力的药物。

（四）其他化学试剂诱导 IBD

除了 TNBS、DSS、OXZ 外，其他化学试剂如乙酸、叉角菜胶、碘乙胺、过氧化亚硝酸钠也能诱导肠道炎症。乙酸诱导结肠炎模型方法简单、成本低、周期短、成功率高、重复性好，结肠黏膜中花生四烯酸代谢产物前列腺素 E2（PGE2）、血栓素 B2（TXB2）、5-羟基廿碳四烯酸（5-HETE）、白细胞三烯 B4（LTB4）等的水平明显增高，与人 UC 相

似。该模型的病理特点是急性炎症性反应，故可用于 IBD 的急性炎症介质作用机理的研究，可作为人 UC 的致炎机理研究及抗炎药物筛选的动物模型。缺点是结肠炎症以急性单纯性黏膜炎症为主，不能反应 IBD 慢性病变过程，不能确切反应人类 IBD 免疫学机制和遗传学机制。单纯乙酸诱导的结肠炎模型为急性结肠炎模型，目前已较少使用。

角叉菜胶（carrageenan）是红海藻类中提取的一种硫酸多糖，其相对分子质量高达 10 万～80 万，用低浓度酸水解可得到致炎效果很强的相对分子质量为 30 000 的降解产物。将角叉菜胶与高压灭菌水配制成 3%角叉菜胶水溶液让豚鼠自由饮用（不同动物发生病变的时间不同，与给动物饮用的降解的角叉菜胶水溶液浓度有关）可以诱导结肠炎。角叉菜胶模型的机制是肠道黏膜吞噬细胞吞噬肠道内的角叉菜胶，降解后的角叉菜胶破坏溶酶体膜，释放各种水解酶损伤结肠上皮细胞间的紧密连接，导致黏膜通透性增加，肠黏膜屏障功能被破坏后，肠腔内抗原进入黏膜和黏膜下层，引起继发性炎症反应。无菌情况下无法诱发此模型，因此认为细菌在此模型的 UC 发病中具有重要作用。该模型的优点是制作简单，重复性好，持续时间长，一般急性期 3～6 周，持续 6～8 周，停止饮用角叉菜胶后炎症持续 1～2 周。缺点是模型动物多用豚鼠，成本较高，周期较长，不适用于人免疫学和基因学的研究，目前多用于 UC 菌群研究和抗菌药物的评估。

二、抗原诱导炎症性肠病模型

（一）胞壁酰二肽诱导 IBD

胞壁酰二肽（muramyl dipeptide，MDP）是细菌细胞壁的重要成分。将 MDP 与完全弗氏佐剂混合制成抗原乳剂免疫动物，可诱导结肠炎。MDP 可刺激巨噬细胞，促进淋巴因子释放，增强 B、T 淋巴细胞的功能，增加肠黏膜渗透性和 MPO 的活性以及促进 NO 和胶原合成，从而导致结肠炎的发生。该模型适用于研究 CD 的慢性病程。少数模型大鼠会出现多发性关节炎，需要注意。

材料与试剂

胞壁酰二肽

完全弗氏佐剂

1ml 注射器

步骤

1）称重并标记大鼠。

2）将 MDP 与完全弗氏佐剂等量混匀，制成抗原乳剂。

3）在大鼠肛门至结肠远端 10cm 的肠壁上选定 6 个不同部位，各注入抗原乳剂 0.1ml。

4）每 1～2 周 1 次，多次注射。

5）监测 IBD 发生。

（二）异体结肠黏膜诱导 IBD

异体结肠黏膜作为抗原刺激诱发慢性免疫性炎症，分离新鲜结肠黏膜组织，提取组

织蛋白抗原，与完全弗氏佐剂混合制成抗原乳剂后，免疫大鼠，造成局部 Arthus 反应（局部过敏坏死反应），产生结肠炎。该模型的特点是病变持续时间较长，与人 UC 的免疫发病机制和病理变化均较接近。但造模过程较繁琐，周期较长，掌握困难，重复性不理想，难以达到科研实验的要求，目前已减少应用。

材料与试剂

新鲜结肠黏膜组织
匀浆器
BCA 蛋白浓度测定试剂盒
完全弗氏佐剂
1ml 注射器
3.5F 导尿管（直径 1.2mm 硅胶导管）或者钝头灌胃管二选一

步骤

1）称重并标记大鼠。
2）取家兔或人新鲜结肠黏膜组织制成匀浆。
3）多次冻融后低温下 1000*g* 离心 30min，取上清测定蛋白质含量。
4）将黏膜组织蛋白质与完全弗氏佐剂等量混匀，制成抗原乳剂。
5）第 1 天于大鼠足跖注射抗原乳剂 0.4ml（含抗原 4mg）。
6）第 10、17、24、31 天分别于大鼠不同部位皮下注射抗原乳剂 0.8ml（含抗原 8mg）。
7）第 31 天不加佐剂予抗原 4mg 灌肠。
8）监测 IBD 发生。

三、$CD4^+CD45RB^{hi}$ T 细胞诱导炎症性肠病模型

$CD4^+$ T 细胞分为 $CD45RB^{hi}$ T 细胞和 $CD45RB^{low}$ T 细胞两个亚群，$CD45RB^{hi}$ T 细胞分泌 IL-2 较 IL-4 多，为效应性淋巴细胞，而 $CD45RB^{low}$ T 细胞则相反。用 CFA 和卵清蛋白（ovalbumin，OVA）制成的乳化抗原免疫小鼠，分离小鼠脾脏和淋巴结中的针对 OVA 抗原的特异性效应淋巴细胞 $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 细胞转移至 SCID 小鼠，建立以该特异性效应细胞为主的免疫系统，使模型小鼠易于对外来抗原产生免疫反应，导致结肠炎症产生。建模小鼠体内 IFN-γ、TNF 水平明显增高。该模型是 Th1 型免疫反应为主的模型，主要用于研究肠道抗原在 IBD 发病中的作用机制。

材料与试剂

BALB/c 小鼠（8～10 周龄）
严重联合免疫缺陷小鼠（8～10 周龄）
PBS
Tris NH_4Cl
抗 FcγR 抗体
大鼠血清

100 目无菌不锈钢网
15ml 及 50ml 锥底聚丙烯离心管
振荡器
流式细胞分选仪
细胞技术仪
1ml 注射器

步骤

1）取 BALB/c 小鼠脾脏，收集 10 个脾脏，用 PBS 轻柔研磨，使之通过 100 目不锈钢网制成单细胞悬液。
2）将细胞转移至 50ml 锥形聚丙烯离心管中，4℃ 下 200*g* 离心 5min，弃上清，在振荡器上振荡存留的细胞团块，加入 Tris NH_4Cl 2ml 室温静置 2min，加入 40ml PBS 稀释后，4℃下 200*g* 离心 5min，弃上清。
3）加入抗 FcγR 和大鼠血清 4℃封闭 15min。
4）加入 FITC 抗 CD4，PE 抗 CD45RB 荧光标记抗体，4℃标记 30min，参见第二十五章分选 $CD4^+CD45RB^{hi}$T 以及 $CD4^+CD45RB^{low}$T 细胞。
5）用 PBS 重悬 $CD4^+CD45RB^{hi}$T 细胞至 4×10^6 个/ml，重悬 $CD4^+CD45RB^{low}$T 细胞至 2×10^6 个/ml。
6）称重并标记严重联合免疫缺陷（severe combined immune deficiency，SCID）小鼠。
7）取 4×10^5 个（100μl）$CD4^+CD45RB^{hi}$T 细胞，用 PBS 稀释至 200μl 经腹腔注射给 SCID 小鼠，阴性对照：混合 4×10^5 个（100μl）$CD4^+CD45RB^{hi}$T 细胞和 2×10^5 个（100μl）$CD4^+CD45RB^{low}$T 细胞腹腔注射给 SCID 小鼠。
8）监测 IBD 发生。

四、转基因和基因敲除炎症性肠病模型

转基因和基因敲除炎症性肠病模型的发现具有一定的偶然性。被修饰的基因大都与免疫功能有关，包括 T 细胞受体（T-cell receptor，TCR）、IL-10、IL-12、IL-2R、G 蛋白基因和编码 TNF-α 富含亮氨酸部分（AU-rich element，ARE）基因等。尽管目前文献已报道了大量转基因和基因敲除炎症性肠病模型，但该模型因制作困难，成本高，在实际应用中受到了一定的限制，然而此模型对研究阐明遗传和免疫致病机制起到了重要作用，为研究 IBD 的基因和生物治疗提供了重要工具。

（一）HLA-B27 转基因小鼠 IBD 模型

HLA-B27 基因与人类脊柱关节炎有关，是一种炎症基因，转基因成功的小鼠可自发肠道炎症。它是 Th1 细胞介导的免疫反应。肠道菌群与该模型发病有关。目前这种模型广泛应用于肠道菌群在 IBD 发病机制中作用的研究。

（二）STAT-4 转基因小鼠 IBD 模型

STAT-4 是一种转录调节因子，与 IL-12 受体信号转导有关，而 IL-12 是一种促炎

性细胞因子。异常的 IL-12 信号参与激活 Th1 途径，破坏肠黏膜免疫系统平衡，引起免疫紊乱而产生免疫病理反应导致肠组织炎症。目前这种动物模型主要用于研究 IL-12 与 IBD 的关系。

（三）*TCR-α* 基因敲除小鼠 IBD 模型

TCR 在 T 细胞介导的免疫反应中发挥重要作用。*TCR-α* 缺陷小鼠在 8～9 月龄时可自发 IBD，而在 1 周龄时感染小球隐孢子虫后，4 周龄时即可诱发 IBD，两者病变类似。该小鼠的 $CD4^+$ TCRγδ 细胞是介导结肠炎形成的主要效应 T 细胞，主要产生 IL-4，IL-4 抗体治疗可抑制 $TCR^{-/-}$ 小鼠结肠炎活动度，倾向于 Th2 型结肠炎。*TCR-α* 基因缺陷小鼠常用于研究 T 淋巴细胞和肠道细菌或抗原在 IBD 病因和发病机制中的作用，该模型的病变分布、组织学和免疫学特征均类似人类 UC。

（四）*Gαi2* 基因敲除小鼠 IBD 模型

G 蛋白参与多种细胞内信号转导通路，具有调节细胞的分化、增殖等功能。Gαi 蛋白是 G 蛋白的一个亚基，在信号转导过程中起抑制腺苷酸环化酶、激活磷酸肌醇 3（PI-3）α 和活化钙通道的作用。Gαi2 是 Gαi 的一个亚型。G 蛋白 αi2 亚单位缺陷小鼠可发生自发性结肠炎。在 SPF 环境中，C57BL/6 基因背景的 $G\alpha i2^{-/-}$ 小鼠在 25 周龄时出现结肠炎症状，结肠炎的产生与记忆性 $CD4^+$ T 细胞和 Th1 型 T 细胞活性增加有关，表现为 IL-2、IFN-γ 和 IL-1β 等升高，而 IL-4 和 IL-5 无明显变化，病理改变类似人类 UC。

（五）IL-10 基因敲除小鼠 IBD 模型

IL-10 由活化的巨噬细胞和 Th2 型 T 淋巴细胞产生，在维持肠道正常免疫、抑制 Th1 型免疫反应和单核巨噬细胞的抗原提呈中起关键作用。$IL\text{-}10^{-/-}$ 肠炎是 Th1 细胞介导的免疫反应。目前一般认为这种结肠炎的主要病因是小鼠不能控制正常肠道抗原的免疫反应，因此肠道细菌抗原在 IBD 的发病中有重要作用。小鼠在 GF、SPF、普通环境下都能发病。不同环境下饲养的 IL-10 缺陷小鼠发生的肠炎的严重程度不同，普通环境下饲养炎症最严重，SPF 环境次之，GF 环境下最轻。这种模型主要用于研究肠道菌群与 IBD 的关系。

（六）IL-2/IL-2R 基因敲除小鼠 IBD 模型

IL-2 由激活的 T 淋巴细胞产生，有放大免疫效应、促进 B 淋巴细胞分化以及活化巨噬细胞、NK 细胞和淋巴因子激活杀伤细胞（LAK 细胞）的作用。目前认为 $IL\text{-}2^{-/-}$ 肠炎发病机制主要是由胸腺依赖的 $CD4^+$T 细胞介导的，其可侵入结肠、骨髓，导致结肠炎症、贫血和 B 淋巴细胞缺失。此外，在 IL-2 基因缺陷小鼠，调节性 T 细胞（Treg）不能抑制 Th1 型 T 细胞产生 IFN-γ。这些都会导致结肠炎的发生。在 SPF 环境下，C57BL/6 基因背景的 $IL\text{-}2^{-/-}$ 小鼠自发 Th1 增强的免疫反应，与 CD 类似。5 周龄小鼠即存在一些免疫学指标异常，如肠道固有层中巨噬细胞和树突状细胞增多，IL-1 和 TNF-α mRNA 水平增高。血清淀粉样蛋白 A、P 水平常在发病前明显增高，并与病情严重程度有关。7 周龄后，结肠 IL-1、IL-6、TNF-α、IFN-γ 和 IL-10 表达增高，18 周

龄后有明显腹泻和血便，溃疡主要位于远端结肠，肠道免疫球蛋白水平明显降低，28～32 周，小鼠死于严重结肠炎。

（七）*TNF-α ARE* 基因敲除小鼠 IBD 模型

TNF-α 是 IBD 的重要介质，尤其与 CD 密切相关。TNF-α 抗体在 CD 的临床治疗中取得了较好疗效是其有力的佐证。TNF-α ARE（AU-rich element，ARE）与 TNF-α mRNA的降解有关，通过基因敲除 *TNF-α* 基因上的 ARE 后，TNF-α 的降解减少，TNF-α 水平明显升高，可自发性发生类似人类 CD 的结肠炎。该模型对研究 TNF-α 引起 CD 的作用机制具有重要价值。

五、自发性炎症性肠病模型

自然界的一些动物可自发产生与人类 IBD 相似的肠炎，这样的肠炎模型被看做是自发性 IBD 动物模型。这类模型理论上更接近于人类 IBD，是较理想的动物模型，但由于此类模型肠道炎症较难进行标准化控制，且动物稀少、昂贵，很难应用该模型进行大规模实验及从事更深入的研究。

绢毛猴是一种灵长类动物，又是一种濒危动物，笼养后可自发出现类似人溃疡性结肠炎 UC 的症状，如腹泻、血便、体重下降，发病率为 50%。笼养 5 年，40%的动物伴发结肠腺癌。组织学改变为结肠上皮增生、隐窝缺失、炎性细胞浸润固有层，晚期黏膜萎缩，病变弥散于全结肠。该模型最大的特点是癌变前呈现出类似人 UC 的复发-缓解-复发的病情变化。绢毛猴模型适用于研究 UC 的病因（尤其是遗传学和免疫学方面）、组织学改变和疾病活动度。但该种动物难以大量获得，观察过程长，肠道炎症较难控制，使其应用受到限制。

C3HeJ Beir 小鼠可自发性发生类似 UC 的结肠炎，其发病与携带的幽门螺杆菌有关。

SAMP1/Yit 小鼠可自发性发生与 CD 相似的末段回肠炎。

第七节　气道高反应性动物模型

支气管哮喘是呼吸系统一种常见病与多发病。有关哮喘发病机制的探索、新治疗方法的评价、新药研究与开发都主要依赖于动物实验。气道炎症和气道超敏反应（AHR）是支气管哮喘的特征性标志。常用 OVA 作标准变应原来致敏和激发动物。支气管哮喘的发病机制比较复杂，迄今为止还没有一种动物模型与人类哮喘的状况完全相同（Szelenyi，2000）。

豚鼠是使用最广泛的变应性疾病动物模型。尽管这种动物与人类有极大差异，但致敏豚鼠的过敏性支气管收缩在研究抗过敏、支气管扩张药物方面仍然是最常使用的模型。致敏豚鼠的支气管过敏反应是常用的“速发型”变态性支气管收缩模型（Richerson，1972），这类模型的发病机制与人类的哮喘症相仿，同属Ⅰ型变态反应，其模型发病快，阳性率极高，但病程短，有些动物可发生急性过敏性休克而死亡。大鼠作为哮喘模型动物有许多优点，如来源广、繁殖快、易饲养、生物学试剂易获得等。主动致敏处

于麻醉状态下的 BN 大鼠，雾化吸入卵白蛋白可诱发迟发相支气管痉挛（Waserman，1992）。与其他动物相比，小鼠哮喘模型具有许多优势，如成本较低。近几年随着生物测定技术的提高，有大量相关分子生物学试剂及抗体供选择，小鼠哮喘模型受到越来越多的关注，在国外已成为主要的鼠类哮喘模型。常用的有 BALB/c 小鼠、C57BL/6 小鼠。由于已有大量特异性小鼠细胞因子和黏附分子等免疫学试剂，小鼠模型便于进行变应性反应的机制研究。气道重塑是机体损伤性刺激的一种修复反应。哮喘的气道重塑主要在于气道的持续性损伤和结构异常，并影响疾病的转归，增加治疗难度。Kenyon 等（2003）用 BALB/c 小鼠建立了一种接近支气管纤维化的动物模型，同时合并气道高反应性的发生。

一、OVA 诱导的呼吸道超敏反应

重复免疫 OVA 与明矾佐剂混合物后可诱导强烈、持久的 Th2 型呼吸道过敏反应，并以产生变应原特异性 IgE、IgG，以及嗜酸性粒细胞浸润特征的气道炎症及 AHR。

材料与试剂

任意种类的雌性小鼠，6～12 周龄，无病原菌无 OVA 饮食（食物中不含有鸡蛋黄成分）

40%及 1%（质量体积比）鸡 OVA（V 级，Sigma）溶于无菌 PBS

氢氧化铝明矾溶液（Pierce）

无菌 PBS

超声雾化器

30cm×30cm×20cm 丙烯酸树脂盒

步骤

1）按 1∶1 比例混合 40% OVA 和明矾溶液，37℃，水平振荡器上振摇 30min。小鼠腹腔注射 100μl 混合液（含有 20mg OVA 及 2mg 明矾），13d 再次免疫。阴性对照组小鼠仅腹腔注射 PBS。

2）免疫第 28 天，将小鼠置于 30cm×30cm×20cm 丙烯酸树脂盒内，用密封的塑料管连接超声雾化器，将含 1% OVA 的 PBS 雾化后入盒（图 30-1）。让小鼠暴露于 OVA 雾化室中 20min，保持持续的 5Pa 压力。第 29 天和第 30 天重复上述试验。

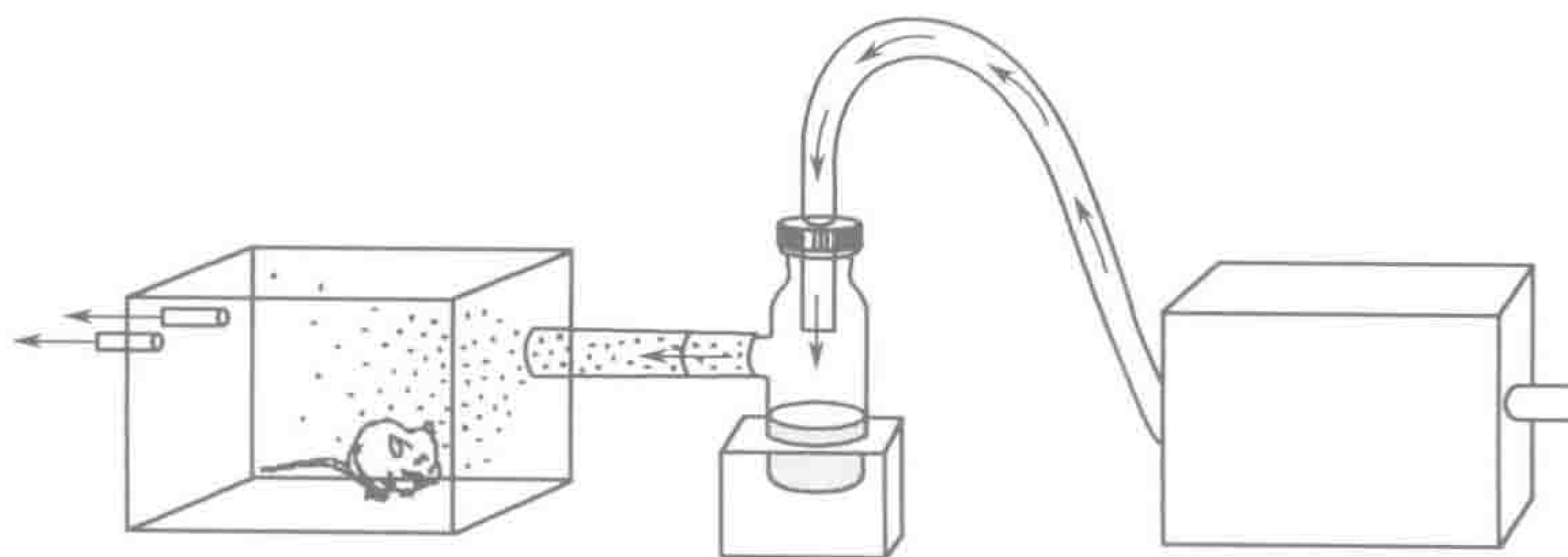


图 30-1　气道激发装置

3）免疫第 32 天，通过全身体积气压描记器评定小鼠气道反应性。同一天，评定 T 细胞的功能和炎症。

注意事项

确保试验室通风良好以避免实验人员对 OVA 过敏。

二、使用 WBP 检测呼吸道过敏反应

将未麻醉的小鼠放入仪器内，检测对吸入性刺激物的气道反应。乙酰胆碱是一种非特异性支气管收缩刺激剂，也可用来评定人类患者的肺功能，故能够用来确定非特异性 AHR。

材料与试剂

OVA 致敏/激发及对照小鼠（见步骤）

乙酰胆碱（MCh；Sigma）用 PBS 分别配成 50mg/ml，25mg/ml，12.5mg/ml，6.25mg/ml

无菌 PBS

气压描记器（WBP；图 30-2）带有前置放大器和压力传导管（Buxco）

超声雾化器

橡皮塞

资料采集卡（Buxco）

气流参数分析软件包（Buxco）

PC（最小 75MHz Phentium，16MB RAM）和监视器

统计分析软件包（如 JMP、SPSS 等）

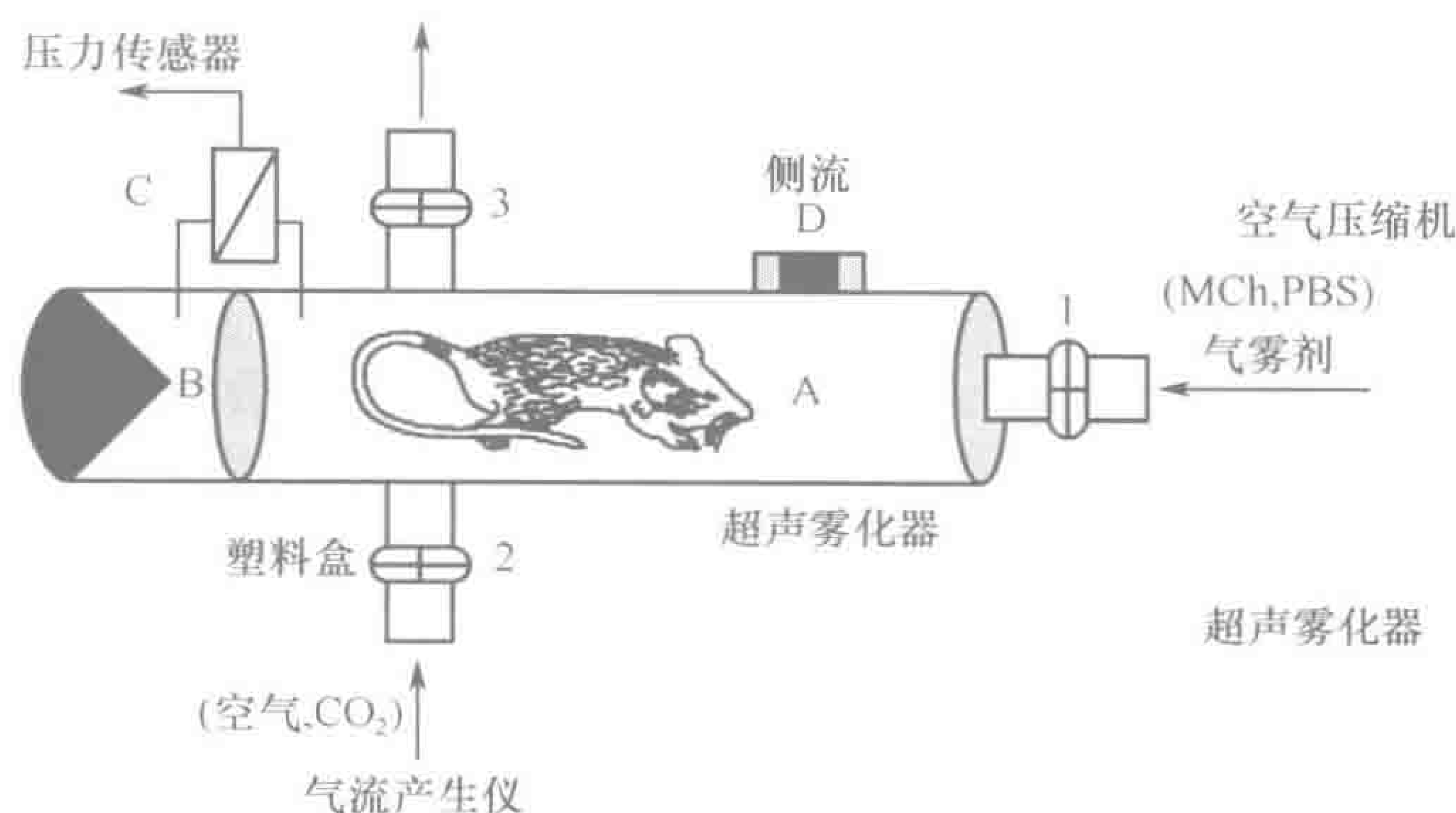


图 30-2　WBP 流程示意图

A. 装有小鼠的主仓；B. 参照仓；C. 压力传感器连接分析仪；D. 呼吸速率计。1. 气雾剂主入口由阀门关闭；2. 侧入口装有四通道开关；3. 气雾剂出口装有四通道开关

步骤

1）连接 WBP 主要入口和雾化器，侧面入气孔连接气压泵，橡皮塞紧密塞住 WBP

出口。压力传感器连接主仓出口和参考仓。将压力传感器与前置放大器连接，带有资料采集卡（Buxco）的 PC 连接前置放大器。

2）利用软件按照供应商的要求校准前置放大器。

3）将小鼠放入 WBP 的主仓内并记录 3min 基本读数（$Penh_{base}$）。使小鼠暴露于雾化的 PBS 并记录 3min 读数（$Penh_{PBS}$）。使用逐步增加浓度的 MCh（倍比稀释）3.125mg/ml、6.25mg/ml、12.5mg/ml、25mg/ml 以及 50mg/ml 重复上述测量。

4）计算每一只小鼠每 3min 记录的平均 Penh。计算每个 MCh 浓度点时 $Penh_{MCh}$ 较 $Penh_{PBS}$ 增加的倍数 Penh。Penh＝$Penh_{MCh}$/$Penh_{PBS}$。

气道反应性表示为“增加值 Penh”，可作为反映气道功能变化的参数。

Penh 是一种实验性参数，反映盒中吸气和呼气时流量波形的变化，与呼吸早期和晚期盒中气压比较相一致（图 30-3）。

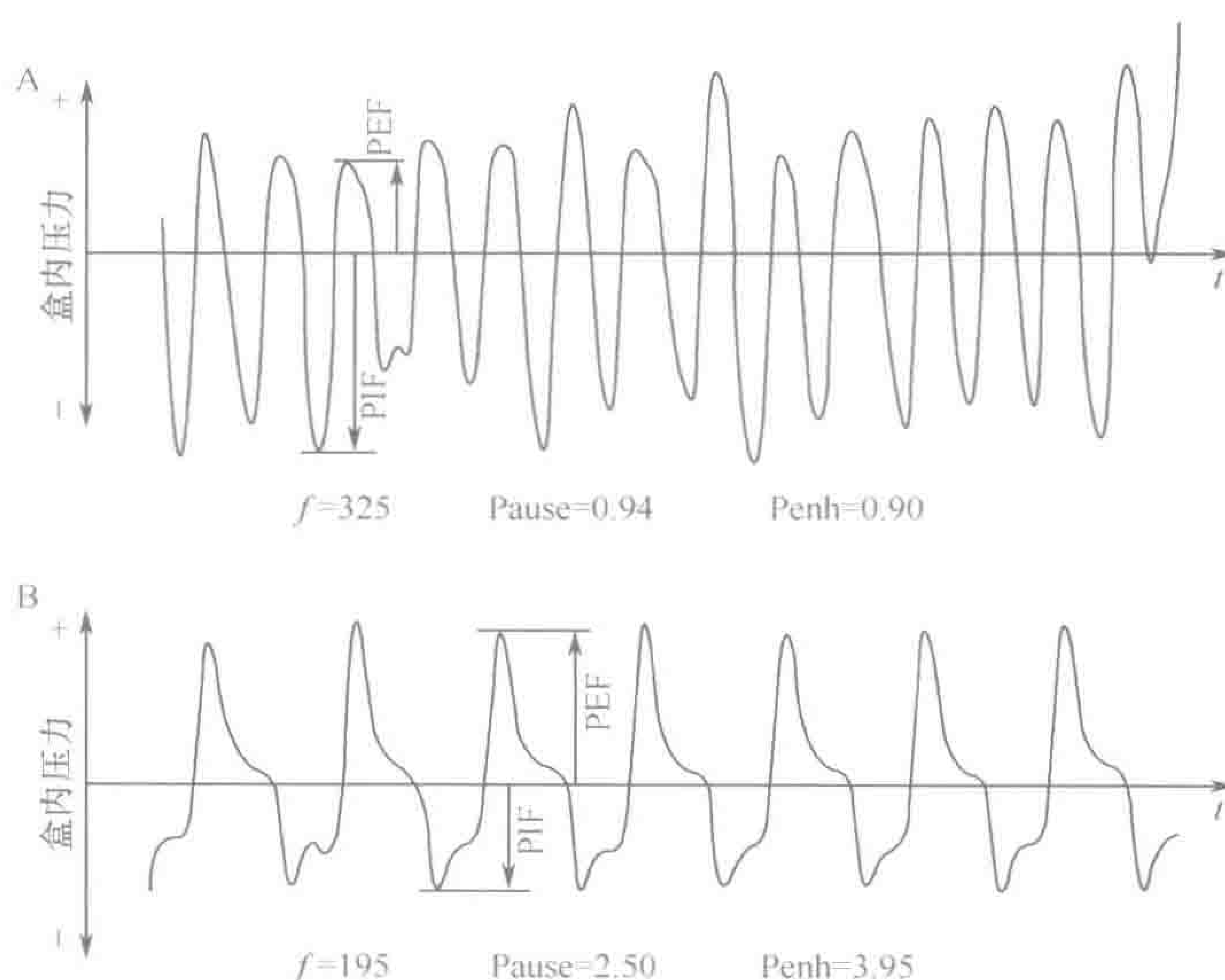


图 30-3 MCh 刺激引起盒内气流波形的变化

盒内气流波形来源于正常小鼠受到（A）PBS 雾化剂或（B）MCh 雾化剂（50mg/ml 溶于 PBS）雾化 3min。*f*，呼吸频率（呼吸次/min）；Penh，延长型暂停；PIF，最大吸气量；PEF，最大呼气量。暂停的定义是（$t_{呼吸}-t_{休息}$）/$t_{休息}$，而 $t_{休息}$ 是压力衰减至总的呼吸压力信号的 36%时的时间

5）将变应原致敏/激发小鼠与对照小鼠进行比较：每一组的全部资料并用均数±标准误来表示。运用多组比较来分析组间差别（变异度分析或 ANOVA）。用 Student's *t* 检验分析 MCh 剂量组之间的差别；用 Tukey-Kramer HSD 检验比较所有组间或组内差别。

注意事项

1）最多可以同时测量并记录 8 只小鼠的资料。一般最好一次操作 4 只小鼠。

2）当食入或吸入以及直接接触乙酰胆碱时对眼睛、鼻子和气道有刺激性。整个实验工程中需要戴手套和眼镜，在雾化时保证适当的通风。

3）对于高反应性种类的小鼠（BALB/c），将变应原致敏和激发过的小鼠暴露于 25mg/ml 和 50mg/ml MCh 会导致死亡。仔细观察高浓度吸入组的每一只小鼠的反应，必要时及早停止吸入。观察呼吸缓慢（正常频率>100 次/min），呼吸暂停以及眼睛突出。

三、OVA 致敏气道诱导气道超敏反应

专一通过气道致敏是模拟空气变应原致敏的固有模式。因为未使用任何佐剂，IgE 的产生和气道炎症反应低于全身致敏。

1）如前所述，在一个塑料盒里最多可放置 8 只小鼠于雾化的 1%OVA PBS 中暴露 20min。每日重复一次，共 10d。使用 PBS 作阴性对照。

2）第 12 天，通过电场刺激实验评定小鼠气道反应性。

四、体外检测气道对电刺激的反应性

材料与试剂

OVA 处理的气道致敏小鼠及对照小鼠

95%O_2/5%CO_2 混合气体，37℃pH7.43，维持于 37℃

krebs-henseleit 溶液，37℃

解剖器械

器官池

三角形不锈钢组织支架

玻璃钩

金属线

等长压力传感器（FT.03，Grass Instrument）

连接刺激溶液设备的 Grass S44 stimulator（SIU 5，Grass Instrument）

张力记录仪（Model R612，Sensor Medics）

步骤

1）颈脱位法处死小鼠，制备长度的 0.5cm 的气管平滑肌片段并去除疏松结缔组织。确保不损伤气管且不广泛清除肌肉片段。

2）在器官池中放入组织，用三角形不锈钢组织支架纵向支撑，浸泡入 37℃ krebs-henseleit 溶液。确保标本的膜部分放置在支架之间以便最大化记录等长收缩所产生的张力。

3）通过在 krebs-henseleit 溶液吹入 95%O_2/5%CO_2 混合气体，37℃（pH7.43），冲洗组织。支架下面用玻璃钩支撑于器官池底部支架上侧用金属线与等长压力传感器相连。通过压力传感器维持 1.5g 的压力来平衡池中每一个组织片段 90min。

4）从 0.5～50Hz 分 5 步增加电压刺激组织，维持每一次刺激直到获得最大肌肉收缩反应。记录静息张力和每次刺激后张力。连续刺激之间允许肌肉恢复 2min。

5）在每次试验的最后，吸去纱布垫上的气管片段并称重。可以用等长张力（g）除以气管片段重量（g）表达张力或占电刺激（EFS）最大张力的百分率来表达张力，如达到50%最大张力的电频（ES_{50}）。

注意事项

1）可以同时测量并记录来源于8只小鼠的肌肉标本。每一个标本需要一个水池和传感器。

2）对于小鼠气道，40Hz电压能够产生最大的收缩反应伴随最小组织损伤。

第八节　糖尿病动物模型

糖尿病（diabetes mellitus，DM）是一种由于体内胰岛素绝对或相对不足而导致的以高血糖为特征的内分泌代谢性疾病。临床主要表现为"三多一少"，多尿、多饮、多食和身体消瘦，兼有疲乏、烦渴等症状。临床上糖尿病分为1型糖尿病和2型糖尿病。1型糖尿病患者体内产生胰岛素的细胞已经彻底损坏，完全失去了产生胰岛素的功能，因而需要终身使用胰岛素治疗，约占糖尿病患者的10%以下。2型糖尿病又称非胰岛素依赖性糖尿病（noninsulin dependant diabetes mellitus，NIDDM），占糖尿病患者90%以上，是由于胰岛素分泌相对不足或靶细胞对胰岛素敏感性降低，引起糖、蛋白质、脂肪代谢紊乱和继发的水、电解质紊乱，患者体内产生胰岛素的能力并非完全丧失。胰岛素抵抗是2型糖尿病的主要始发因素，动物是否发生胰岛素抵抗是区分1型和2型糖尿病动物模型的关键。

建立理想的动物模型在糖尿病研究中起着至关重要的作用，目前较常用的动物模型可分为实验型、转基因型和自发型糖尿病模型。

一、1型糖尿病模型

用手术、物理或化学的方法彻底破坏胰岛细胞导致胰岛素分泌绝对缺乏，从而建立1型糖尿病模型。

（一）胸腺切除诱导1型糖尿病

成年Lewis大鼠胸腺切除后给予4次亚致死剂量的γ射线照射，在照射后的3～18周，大鼠会出现严重的体重丢失和高血糖以及急性快速致死性症状。雄性大鼠的造模成功率（98%）高于雌性大鼠（70%）。

材料与试剂

Lewis大鼠（6周龄）
血清葡萄糖检测试剂
甲氧氟烷
乙醇
小动物剪刀
解剖板
无菌钝头虹膜剪刀

无菌钝头止血钳

无菌钝头牵引器

缝线

无菌棉棒和 9cm 缝合夹

步骤

1）取大鼠血液测定血清葡萄糖基础水平。

2）甲氧氟烷麻醉大鼠，固定大鼠，用 70%乙醇擦拭颈部和上胸部。

3）在大鼠胸腺区域（颈下到上胸部）做 2～2.5cm 皮肤切口，用钝头虹膜剪刀沿中线剪开胸骨柄和胸部肌肉，剪出 1～1.5cm 切口，用钝头牵引器和止血钳牵引，分离胸腺。

4）缝线缝合胸骨柄以及皮肤，清洁切口，将动物放回洁净的笼子。

5）胸腺切除后 2 周，将大鼠暴露于 250rad γ 射线，每 2 周照射 1 次，共照射 4 次。

6）最后一次照射后称重。

7）监测糖尿病发生。

临床症状改变 监测动物进食量、饮水量、小便量以及体重的变化。

实验室检查 检测动物血糖、血脂以及血清胰岛素水平的变化；一般以非空腹血糖>16.7mmol/L，或尿糖+++连续 3d 以上，作为糖尿病模型成功的标志。

病理检查 麻醉动物后处死，分离动物的胰腺组织，制备石蜡病理切片，并进行 H-E 染色（参见第二十七章），分析胰腺组织结构、胰岛细胞破坏和炎症细胞浸润程度，计算胰岛炎症指数。

胰腺组织炎性细胞浸润程度 0 级：无浸润；1 级：胰岛周边而非侵入胰岛内的血管周围或导管周围出现淋巴细胞浸润；2 级：淋巴细胞浸润达胰岛大小的 25%；3 级：淋巴细胞浸润达胰岛大小的 75%；4 级：末期胰岛炎，<20%胰岛存在。

胰岛炎症指数

$$I=[(0\times n_0)+(1\times n_1)+(2\times n_2)+(3\times n_3)+(4\times n_4)]/4\times(n_0+n_1+n_2+n_3+n_4)$$

式中，n_0、n_1、n_2、n_3、n_4 分别为按照 0、1、2、3、4 级评定的胰岛数目。

（二）胰腺切除诱导 1 型糖尿病

大多数动物（狗、猫、大鼠、兔、犬、猴等）在行胰腺大部切除（一般 80%～90%）后，残存的胰岛受到高糖饮食刺激后使胰岛细胞功能衰竭形成永久性糖尿病，或结扎动物胰管加高糖饮食使胰岛形成明显的退变而形成糖尿病。该方法比较稳定，但对小动物来讲，手术较复杂，术后可能发生十二指肠坏死等并发症，现仅少量应用。

（三）四氧嘧啶诱导 1 型糖尿病

四氧嘧啶是胰岛 β 细胞毒剂，通过产生超氧自由基直接破坏 β 细胞，此外它能激活多聚 ADP 核糖体合成酶活性，从而使辅酶 I 含量下降，导致 mRNA 功能受损，β 细胞合成前胰岛素减少，共同导致胰岛素缺乏。给动物一次腹腔注射 1%～5%的四氧嘧啶水溶液 100～200mg/kg 或静脉注射 40～100mg/kg 可使实验动物的 β 细胞很快受到损

害，注射后 24h 可出现持续性高血糖，β 细胞呈现不可逆性坏死。四氧嘧啶水溶后不稳定，应现用现配，此外由于四氧嘧啶的血浆半衰期仅 1～2min，故能快速成模，且注射速度越快成模率越高。但大剂量的四氧嘧啶可致动物酮症酸中毒而死亡。因此，使用 Alloxan 制备糖尿病模型时要严格控制剂量。四氧嘧啶诱导的糖尿病模型是目前最常用的 1 型糖尿病动物模型之一。

（四）病毒诱导 1 型糖尿病

脑炎病毒、心肌炎病毒等对 β 细胞有选择性毒性作用，能诱发胰岛 β 细胞脱颗粒、坏死，导致胰岛 β 细胞破坏，出现糖尿病症状，可得到 1 型糖尿病模型。而柯萨奇病毒等通过诱导机体产生自身免疫反应可引起 2 型糖尿病。使用环孢菌素 A 等免疫抑制剂可以提高造模成功率。病毒诱导的糖尿病由于感染因素的存在，故较少使用。

二、2 型糖尿病模型

（一）单纯高脂高糖饮食诱导 2 型糖尿病

给实验动物过量的食物或高蛋白、高脂、高糖饮食，均可使动物胰岛 β 细胞负荷过重而发生萎缩，从而引起糖尿病，建立胰岛素抵抗的动物模型。该模型为深入研究 NIDDM 的发病机制，阐明营养因素与糖尿病的关系提供了重要线索及实验依据，也为广泛开展 NIDDM 的实验研究提供了良好的动物模型。该模型与人类发病情况较接近，其不足是实验成本较高，造模时间长，造模成功率不高。

1）高糖摄入：用 12%的果糖水喂养 Wistar 大鼠 2～3 个月。

2）高脂高糖摄入：高脂高糖饲料（10%猪油、37%蔗糖、混合 53%基础饲料），连续喂养小型猪 6 个月，饲养大鼠 2～3 个月，饲养小鼠 4～5 个月。

3）监测糖尿病发生。

（二）链脲佐菌素诱导 2 型糖尿病

链脲佐菌素（streptozocin，STZ）是一种药效强大的烷化剂，能干扰葡萄糖的转运，影响葡萄糖激酶的功能，诱导 DNA 双链的断裂，它可选择性破坏某些动物种属的胰岛 β 细胞，可以使猴、狗、羊、兔、大鼠、小鼠等实验动物产生糖尿病。STZ 可以直接破坏胰岛 β 细胞，也能通过 NO 和自由基途径损伤胰岛 β 细胞，STZ 还能激活自身免疫过程使胰岛 β 细胞损害加重，造成胰岛素分泌减少和胰岛素抵抗。STZ 必须 4℃保存及新鲜配制，它对组织毒性小，诱发动物糖尿病模型成功率高，且一般不表现自发性缓解。STZ 单次大剂量注射或多次小剂量注射都能诱导制备 2 型糖尿病模型，STZ 剂量过大易导致动物死亡，而多次小剂量注射可有效模拟糖尿病的病程及发病原理，并降低动物死亡率。小剂量 STZ 注射加特殊膳食诱导能制备具有显著胰岛素抵抗的较理想的 2 型糖尿病模型，且造模时间比特殊膳食诱导短，比自发性糖尿病模型价格低，是目前使用最多的 2 型糖尿病模型制备方法。

材料与试剂

完全弗氏佐剂

STZ

高糖高脂饲料

0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（pH4.5）

1%的 STZ 工作液配制：STZ 溶于 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（pH4.5）

步骤

STZ 可以通过多种途径诱导糖尿病。

1. 单独 STZ 诱导糖尿病

1）大剂量单次静脉注射：造模大鼠禁食 10h，按 50mg/kg 单次尾静脉注射 1%的 STZ 工作液，48h 后开始监测糖尿病症状和体征。

2）小剂量多次静脉注射：造模大鼠禁食 10h，每日按 30mg/kg 给大鼠尾静脉内注射 1%的 STZ 溶液，连续 3d，注射后 72h 开始监测糖尿病的发生。

2. 高脂饲料联合 STZ 诱导糖尿病

1）高脂饲料联合小剂量单次腹腔注射：将模型组大鼠给予高脂饲料，其配方是在标准全价混合饲料的基础上添 10% 的猪油和 10% 的豆油，热能含量为 22.8kJ/kg，喂养 4 周后按 30mg/kg 单次腹腔注射 1%的 STZ，然后继续给予高脂饲料饲养 4 周，监测糖尿病症状和体征。

2）高脂饲料联合小剂量多次腹腔注射：每日按 30mg/（kg·d）左下腹腔注射大鼠，连续 5d，在造模同时喂高脂饲料，监测糖尿病的发生。

（三）催肥诱导 2 型糖尿病

用电凝法或注射金硫葡萄糖选择性破坏下丘脑腹内侧核的饱食中枢，使动物产生贪食，催肥动物，继之发生高血糖、高胰岛素血症和胰岛素抵抗，近似人的 2 型糖尿病。该方法手术要求高，因而应用不多。

（四）激素诱导 2 型糖尿病

给动物注射肾上腺素、生长激素、甲状腺素、胰高血糖素等拮抗胰岛素的作用，可制备内分泌性糖尿病动物模型。肾上腺糖皮质激素和胰高血糖素促进糖原异生，抑制外周组织葡萄糖的利用即降低胰岛素的效能；生长激素使外周组织利用葡萄糖发生障碍，对胰岛素敏感性降低，刺激 β 细胞过度分泌，终致衰竭产生糖尿病。

肾上腺素（AD）进入体内促进肝脏及肌肉糖原分解，肌肉中糖酵解生成的乳酸增多，经三羧酸循环糖异生增快，同时激活丙酮酸羧化酶，使丙酮酸向磷酸烯醇式丙酮酸转化促进糖异生，导致血糖升高。给小鼠皮下注射 AD 240μg/kg，给药后 135min 从小鼠眼底静脉丛取血测血糖。如未完全出现高血糖，应追加注射 1 次 AD，直到出现糖尿病症状。使用肾上腺素建立模型简单、易行，灵敏度高。缺点是 AD 造模所测定的血糖不完全是葡萄糖，专一性不强。

（五）转基因和基因敲除小鼠 2 型糖尿病模型

LEP 是肥胖基因，Lep^{ob} 是影响能量代谢的突变基因，Lep^{ob} 转基因小鼠能自发产生

2 型糖尿病，转基因纯合体出现摄食过量和糖尿病症状。

胰岛素受体缺失（$InsR^{-/-}$）小鼠出现生长迟缓和外周胰岛素抵抗，有高三酰甘油血症和高血压的代谢综合征特征。

葡萄糖转运蛋白 4（glucose transporter type 4，Glut-4）的一个等位基因敲除（$Glut\text{-}4^{+/-}$）可导致严重的外周胰岛素抵抗，继而发展成高血压和糖尿病，且小鼠出现与 2 型糖尿病患者相似的糖尿病性心肌病和脂肪肝。$Glut\text{-}4^{+/-}$ 小鼠是研究非肥胖性 2 型糖尿病的理想模型。

β 细胞特异性葡萄糖激酶（glucokinase，GK）杂合子小鼠（$GK^{+/-}$）由于胰岛素分泌减少，出现轻度糖耐量异常。而胰岛素受体底物 1（insulin receptor substrate 1，IRS-1）的突变会导致 2 型糖尿病的发生。$IRS21^{+/-}$ 和 $GK^{+/-}$ 这两种小鼠杂交产生的双敲除模型出现胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能障碍，进而发展为糖尿病，表明胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷两种因素在 NIDDM 的发病中可能起着协同作用。

（六）自发性 2 型糖尿病模型

实验动物未经任何有意识的人工处理，在自然状态下发生以高血糖、胰岛素抵抗为主要特征的糖尿病称为自发性 2 型糖尿病。

1. SHR 大鼠 2 型糖尿病模型

在人类 NIDDM 和高血压这两种疾病通常是共同发生的，建立糖尿病和高血压共存的动物模型更接近人类发病的模式。将自发性高血压（spontaneously hypertensive rat，SHR）大鼠在新生期给予 STZ 处理，成年可获得 2 型糖尿病合并原发高血压模型。该模型已得到普遍的认可和应用，在糖尿病机制研究和药物疗效评价中发挥重要作用。SHR 大鼠与生俱来的胰岛素抵抗现象使该品种动物成为研究胰岛素抵抗的首选模型。

2. BBZ/WOR 大鼠 2 型糖尿病模型

BBZ/WOR 大鼠是一种杂交系动物模型，不但有糖尿病的临床特点，而且有糖尿病的多种并发症。这种模型雌性鼠发病率很低，一般不超过 3%。而雄性大鼠在大约 10 周龄时就会发生自发性糖尿病。BBZ/WOR 大鼠的突出特点包括血脂紊乱、高血糖、胰岛素抵抗、高血压和葡萄糖转运体-2（GLUT-2）水平的降低。

3. OLETF 大鼠 2 型糖尿病模型

OLEFT 大鼠在 12～24 周龄时出现多食、胰岛素抵抗和轻度肥胖，20～28 周龄时出现高血糖和高胰岛素血症，而到 40 周龄时由于胰岛素分泌缺陷发生低胰岛素血症，晚期合并糖尿病肾脏病变，与人类 2 型糖尿病极为相似。这种大鼠是研究胰岛素抵抗与大血管病变的关系的一个良好的动物模型，但因其价格昂贵且不易获得而限制了它的应用。

4. GK 大鼠 2 型糖尿病模型

GK（Goto-Kakizaki）大鼠表现为胰岛素抵抗、胰岛纤维化等典型的 2 型糖尿病特征。GK 大鼠是现今应用较为广泛的一种 2 型糖尿病模型，有文献报道此类模型可应用于糖尿病并发症，如视网膜、微血管、糖尿病肾病的研究。

5. 肥胖 Zucker 大鼠 2 型糖尿病模型

肥胖 Zucker 大鼠的特征为肥胖、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、高血脂、高血糖、

高血压，受常染色体隐性遗传基因影响隐性基因名称为 fa，其肥胖与血-脑屏障上的瘦素载体减少有关，瘦素与中枢神经系统受体结合能够启动调节摄食和机体能量平衡，此平衡被打破可导致肥胖发生。肥胖 Zucker 大鼠是研究糖尿病血管病变的理想模型。

6. NOD 小鼠 2 型糖尿病模型

NOD 小鼠必须在严格的 SPF 条件下饲养才能出现糖尿病症状，因为环境中的病原刺激 NOD 小鼠的免疫系统可导致超常免疫应答并对胰岛素抵抗。小鼠成年后开始发病，因此 8～10 周龄时开始监测小鼠糖尿病症状。

7. NSY 小鼠 2 型糖尿病模型

NSY 小鼠具有年龄依赖性自发性糖尿病特点和 2 型糖尿病特征。48 周龄雄性鼠发病率 98%，雌性 31%，该鼠在任何年龄都没有太严重的肥胖和胰岛素血症。NSY 小鼠发生 2 型糖尿病的可能机制为胰岛素分泌功能对葡萄糖的刺激反应发生紊乱和胰岛素抵抗，与人的 2 型糖尿病发病机理相似。NSY 小鼠将有助于人们分析 2 型糖尿病遗传学倾向及发病机制的研究。

8. KK 小鼠 2 型糖尿病模型

KK 小鼠是日本学者培育的一种轻度肥胖型 2 型糖尿病动物。近交系 KK 小鼠是典型的多基因糖尿病动物模型，表现为典型的 2 型糖尿病特征，晚期可出现糖尿病性肾病、视网膜病变等并发症。

9. ob/ob 小鼠 2 型糖尿病模型

ob/ob 小鼠（obese mouse）属常染色体隐性遗传性糖尿病动物模型，纯合体动物表现为肥胖、高血糖及高胰岛素血症。遗传背景可决定性状，ob/ob 小鼠与 C57BL/Ks 交配的子代症状严重，而 ob/ob 与 C57BL/6J 交配的子代症状则较轻。

10. db/db 小鼠 2 型糖尿病模型

db/db 小鼠（diabetic mouse）是瘦素（leptin）受体基因缺陷导致的先天肥胖性 2 型糖尿病小鼠。db/db 小鼠具有肥胖、胰岛素抵抗、高血糖、胰岛素血症、高三酰甘油血症等特征，其表现类似于人类的 2 型糖尿病。动物在 1 个月时开始贪食及发胖，继而产生高血糖、高血胰岛素、胰高血糖素也升高，一般在 10 个月内死亡。其发病过程与人 2 型糖尿病非常相似，是国际上广为采用的研究 2 型糖尿病的动物模型。

11. 嗜沙肥鼠 2 型糖尿病模型

嗜沙肥鼠（*Psammomys obesus*，PO）生活在食物来源比较匮乏的草原和沙漠地区，常以灌木的叶子和种子为食，食物所含能量很少，但能保持健康，既不出现肥胖也无糖尿病发生。若给予标准热量实验室饲料 4 个月，90%的 PO 大鼠出现典型的代谢综合征症状群（肥胖、胰岛素抵抗和血脂紊乱）。

12. 中国地鼠 2 型糖尿病模型

中国地鼠（Chinese hamster）学名黑线仓鼠，为自发性的遗传性糖尿病模型鼠，其具有发病缓慢，血糖轻、中度增高和胰岛病变较轻等特点，酷似人类 2 型糖尿病。其 NIDDM 主要发生于雄性地鼠，发病突然，2 月龄发病率为 50%，6 月龄发病率达 80%以上。临床表现为多食、多饮、多尿、血糖和尿糖浓度急剧上升，但在无外源性胰岛素治疗条件

下仍能存活，目前已应用于糖尿病的发病机理、微血管并发病及药物治疗等研究领域。

第九节　免疫性血小板减少性紫癜动物模型

原发性血小板减少性紫癜是一种因血小板免疫破坏，引起外周血中血小板减少而导致皮肤、黏膜及内脏出血的疾病。特点是血循环中存在抗血小板抗体，血小板破坏过多，血小板平均体积偏大，但血小板功能一般正常，急性型骨髓巨核细胞轻度增加或正常，而慢性型骨髓巨核细胞显著增多，巨核细胞发育成熟障碍，表现为巨核细胞体积变小，胞质内颗粒减少，幼稚巨核细胞增加。因此，免疫性血小板减少性紫癜动物模型可分为直接回输抗血小板抗体的被动型模型、通过抗原诱导体内产生抗血小板抗体的主动型模型和基因型模型。

一、抗血小板血清诱导血小板减少性紫癜模型

血小板减少性紫癜（idiopathic thrombocytopenic purpura，ITP）的免疫发病学本质是循环中存在抗血小板因子而引起血小板减少。被动型 ITP 模型的建立主要是通过体内给予多克隆抗血小板抗体，依赖抗体的剂量导致血小板数量的一过性减少，从而发病。先用小鼠血小板免疫豚鼠，制取豚鼠抗小鼠血小板抗血清，将此抗血小板血清输入小鼠体内造成血小板破坏从而建立 ITP 模型，也可以反复输注抗血小板血清（anti-platelet serum，APS）以增加造模成功率。此外，输注商品化的抗血小板膜糖蛋白（platelet membrane glycoprotein，GP）单克隆抗体，如抗 CD41（GP Ⅱb/Ⅲa，克隆号：MWReg30）和（或）抗 CD61（GP Ⅲa，克隆号：2C9. G2）抗体均能诱导 ITP。这里只介绍输注抗血小板免疫血清造模方法。被动型病理模型的优点是，特定的抗原抗体关系已知，能引起血小板数量的暂时变化；其缺点在于不能较好地模拟人 ITP 的病理特点，被动型动物模型难以达到持续产生抗体的要求，故不适用于自身免疫反应的启动及调节机制的研究。

材料与试剂

BALB/c 小鼠，8 周龄，18～22g，雌雄各半

豚鼠，3 月龄，雌雄各半

EDTA-Na_2

梯度离心机

血小板分离所用材料

完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂

步骤

1）用摘眼球或眶静脉采血法收集 BALB/c 小鼠新鲜血液至含有 EDTA-Na_2 抗凝剂的器皿中，梯度离心分离血小板并洗涤，调整血小板浓度为 1×10^9～2×10^9 个/ml。

2）第 1 天取 300μl 上述血小板悬液与等量的完全弗氏佐剂混匀制成乳化抗原。分别于豚鼠的后足掌、背部皮下及腹股沟分多点皮下注射，每点 50μl。

3）第 7 天取 300μl 上述血小板悬液与等量的不完全弗氏佐剂制成乳化抗原分别于豚鼠后足掌、背部皮下及腹股沟（可在原注射点附近）分多点皮下注射，每点 50μl。

4）第 21 天、第 35 天重复步骤 4）。

5）第 42 天取豚鼠不抗凝全血，37℃静置 30min，1000g 离心 10min 后取上清，即为豚鼠抗小鼠血小板抗血清（APS），分装后－20℃冰箱储存备用。

6）将 APS 从－20℃冰箱取出，待完全融化后置于 56℃水浴灭活 30min。

7）抗体效价的检测：参见第七章。

8）急性型 ITP 模型：于 BALB/c 小鼠腹腔内一次性注射抗血清 100μl（1∶4 稀释）。

9）慢性型 ITP 模型：分别在第 1、3、5、7、9、11、13 天于小鼠腹腔注射抗血清，每次 100μl（1∶6 稀释）。

10）监测 ITP 发生：观察小鼠体重以及皮肤、黏膜、内脏出血情况；小鼠出血时间检测；观察外周血象的变化：血小板、红细胞、血红蛋白水平；平均血小板体积（MPV）；骨髓巨核细胞计数、形态观察；检测抗血小板相关抗体（PAIg）水平，如抗 GPIIB/IIIa、GPIb/IX 抗体等；脾脏大小、重量检测以及组织病理学检查观察脾脏中的巨核细胞。

二、异种血小板诱导血小板减少性紫癜模型

通过外源性血小板抗原诱导动物自身免疫系统产生致病性抗体从而发病，该方法又称主动型血小板减少性紫癜造模方法。用大鼠的血小板免疫 CBA/Ht 小鼠，可使该小鼠产生抗血小板 GPIb 的自身抗体，从而导致血小板减少，成功建立免疫性血小板减少性紫癜模型。该模型维持时间较短，约 5 周，且为异种血小板免疫，特别适用于输血后紫癜的研究，但对自身免疫性血小板减少性紫癜，尤其是慢性 ITP 它不是一种理想的动物模型。

第十节　重症肌无力模型

重症肌无力（myasthenia gravis，MG）是一种影响神经肌肉接头（neuromuscular junction，NMJ）传递的自身免疫性疾病，主要累及神经肌肉接头突触后膜上的乙酰胆碱受体（acetylcholine receptor，AchR），其确切的发病机理目前仍不明确。研究较多的是有关重症肌无力与胸腺的关系，以及乙酰胆碱受体抗体在重症肌无力中的作用，且大量的研究发现，重症肌无力患者神经肌肉接头处突触后膜上的乙酰胆碱受体数目减少，受体部位存在抗 AchR 抗体，且突触后膜上有 IgG 和 C3 复合物的沉积。

一、AchR 蛋白诱导自身免疫性重症肌无力模型

乙酰胆碱受体抗体（anti-AchR）的增加是 MG 发病机的主要因素。提取 AchR 蛋白作为抗原免疫小鼠，使小鼠体内产生抗 AchR 抗体，导致 MG 的发生，该模型是常用的实验性自身免疫性重症肌无力（experimental autoimmune myasthenia gravis,

EAMG）模型。由于 AchR 是一种易变性的大分子蛋白质，提取过程中须用新鲜骨骼肌，同时防止蛋白水解酶的破坏，并且整个操作均在 4℃进行。

材料与试剂

新鲜牛肌肉

C57BL/6 小鼠

10mmol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液

Triton X-100

0.01mol/L pH7.4 PBS

高速组织捣碎机

搅拌器

摇床

高速离心机

透析袋

50ml 离心管

完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂

肌电图仪

H_3 测定仪

ELISA 试剂盒

步骤

1）取牛新鲜肌肉剪成 1cm³ 小块。

2）按 4ml 缓冲液/g 肌肉的比例，加入 10mmol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液，用高速组织捣碎机制成组织匀浆。

3）将匀浆倒入 50ml 离心管内，4℃下 17 000*g*（15 000r/min JA20 转子）离心 30min，弃上清，转移沉淀物至搅拌器内。

4）加入与前等体积的 10mmol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液混匀沉淀物，高速搅拌 1min。

5）转移至 50ml 离心管，再加 0.1 倍体积的 Triton X-100 缓冲液，置于 4℃低速摇床振荡 3～4h（或过夜）。

6）转移至超速离心管，4℃下 50 000*g* 离心 30min。

7）吸弃样品表面油脂层，将存留上清倒入 15ml 试管内，丢弃沉淀物。

8）将上述提取物在 10mmol/L pH7.5 PBS 中透析 48～72h。

9）取 10～20μl，用 7.5%聚丙烯酰胺凝胶经 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色，凝胶中应该出现四条带，分别位于 40kDa、50kDa、60kDa、65kDa 处（参见第二十一章）。测定蛋白质含量。原液加入 10%（体积比）甘油，分装后－70℃储存（注意缓慢冷冻）。

10）将 200μg AchR 提取物与等量完全弗氏佐剂混合制成抗原乳剂。

11）第 1 天于双足底、双肩部分多点皮下注射乳化抗原免疫 C57BL/6 小鼠，每点

50μl，对照组小鼠只注射佐剂。（一般初次免疫后 20～30d，约 10%的小鼠会出现肌无力症状。）

12）第 30 天后，将 200μg AchR 提取物与等量不完全弗氏佐剂混合制成抗原乳剂于双肩部和双大腿部分多点皮下注射再次免疫 C57BL/6 小鼠，每点 50μl。

13）监测 EAMG 发生。观察小鼠皮毛光泽、姿态、活动、呼吸、食量。用爪抓紧试验（20～30 次连续的爪抓紧笼子顶部的钢栅）锻炼小鼠以加重肌无力，并可进行 EAMG 评分。0 级：肌张力正常，锻炼后也未出现肌无力；1 级：静息时正常而锻炼后出现肌无力（下颚贴在地板上且头部不能抬起，驼背及运动减少）；2 级：静息时出现肌无力；3 级：濒死、脱水及瘫痪。

肌电图检查：小鼠麻醉固定，将刺激电极的正极插入小鼠坐骨切迹以刺激坐骨神经，将负极插入小鼠腹壁下，将针形记录电极插入小鼠同侧腓肠肌内并将参照电极插入腓肠肌肌腱内，用电刺激器和记忆示波器观察肌电波幅衰减状况。

采血分离血清，用 ELISA 法检测抗 AchR-Ab。

脾淋巴细胞对 AchR 的增殖试验：无菌分离小鼠脾淋巴细胞，用含 20%小牛血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 2×10^6 个/ml，加入 AchR 提取物至终浓度 60μg/ml，铺板，每份标本 3 个复孔并设相应对照，37℃培养 5d，每孔加 3.7×10^4 Bq ^{3}H-TdR 后继续培养 16h，细胞提取后加入水溶性闪烁液，用液体闪烁计数器测 Cpm 值（参见第四章）。

二、抗 AchR 抗体诱导自身免疫性重症肌无力模型

（一）患者血清抗 AchR 抗体诱导 EAMG

直接注射 MG 患者血清中的抗 AchR 抗体，导致体内 AchR 减少，建立抗 AchR 抗体诱导的 EAMG 模型。除了用 MG 患者血清及血清成分制作 EAMG 模型的方法外，用 MG 患者外周血淋巴细胞、MG 患者胸腺组织以及 EAMG 鼠血清抗 AchR 抗体转基因小鼠 NMJ 局部产生的 IFN-γ 均可以建立 EAMG 模型。这里只介绍应用较多的 MG 患者血清抗 AchR 抗体诱导 EAMG。

材料与试剂

MG 患者血液

环磷酰胺

1ml 注射器

蛋白纯化仪

步骤

1）收集未做过手术及未用过激素的典型 MG 患者血液，37℃静置 30min，1000*g* 离心 5min，获得 MG 患者血清，分装后保存在－70℃，备用。

2）每只小鼠注射患者血清 0.5ml/d，连续注射 15d，至步骤 6）。

3）纯化 MG 患者血清，获得全部免疫球蛋白，每只小鼠注射含全部免疫球蛋白（Ig）制成品 0.40～0.65ml/d，注射 10～15d，至步骤 6）。

4）纯化 MG 患者血清中的丙种免疫球蛋白，每只小鼠注射含丙种免疫球蛋白（IgG）制成品 10～11g/d，注射 3～4d，至步骤 6）。
5）步骤 2）、3）、4）任选一。
6）在第 1 次注射 24h 后，每只小鼠按体重 300mg/kg 经腹腔注射环磷酰胺，抑制免疫反应。
7）监测重症肌无力发生。

（二）AchR 单克隆抗体诱导 EAMG

注射抗 AchR 的单克隆抗体，减少体内 AchR 水平，也可诱导 EAMG。用 Ringer's 液配置不同浓度的抗 AchR 单克隆抗体，分别经腹腔注射含 0.5mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg 抗 AchR 单抗的 Ringer's 液 0.2ml 给 C57BL/6 小鼠，对照组注射不含单抗的 Ringer's 液 0.2ml。实验动物的种属在易感性上有很大差别，注射的单抗量也影响造模的成功率，可根据实验需求具体选择。

三、AchR 多肽片段诱导自身免疫性重症肌无力模型

AchR 由 2 个 α、1 个 β 和 1 个 γ 亚基组成，其中抗原决定簇主要分布在 α 亚基上。对于不同动物，其具体抗原决定簇在 α 亚基上的分布序列也不同。因此，选用 AchR-α 亚基的序列片段免疫小鼠，可诱导 EAMG 发生。一般常用加利福尼亚电鳗 AchR-α 亚基的 146-162 序列肽作为免疫原，此外用人类 AchR-α 亚基的 138-167 片段也可以成功诱导 EAMG。

材料与试剂

加利福尼亚电鳗的 AchR-α146-162 序列肽段，氨基酸序列为：Ala-Ile-Phe-Lys-Ser-Tyr-Cys-Glu-Ile-Ile-Val-Thr-His-Phe-Pro-Phe-Asp
pH7.2 的 PBS 缓冲液
完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂
1ml 注射器

步骤

1）AchR-α146-62 多肽 20μg 溶解于 100μL（pH7.2）的 PBS 缓冲液中，与等量的 CFA 充分混合，制成抗原乳剂。
2）第 1 天于小鼠背部、两后肢垫和尾基部多点皮下注射，每点 50μl。
3）第 30 天进行强化接种时，将合成多肽 20μg 溶解于 50μl（pH7.2）的 PBS 缓冲液中，并与等量不完全弗氏佐剂充分混合制成乳化抗原后注射于背部和尾基部等多点皮下注射，每点 50μl。
4）监测重症肌无力发生。

四、转基因小鼠自身免疫性重症肌无力模型

IFN-γ 转基因小鼠在 NMJ 局部产生 IFN-γ，诱发了自身免疫反应，导致 MG 发生。

该转基因小鼠呈现出进行性加重肌无力、迟缓性瘫痪以及 NMJ 功能损坏，重复神经电刺激呈进行性衰减，能被胆碱酯酶抑制剂恢复，运动终板处有单个核细胞浸润及自身抗体沉积，可用于研究 IFN-γ 与 MG 的关系。

（张　婷　韩德平）

参考文献

Chatzigeorgiou A，Halapas A，Kalafatakis K，et al. 2009. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. In Vivo，23（2）：245～258.

Compston A，Coles A. 2002. Multiple sclerosis. Lancet，359：1221～1231.

Costa O，Divouxc D，Ischenkod A，et al. 2003. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG 35-55 peptide in C57BL6/J strain of mice. Journal of Autoimmunity，20：51～61.

Elson CO，Cong Y，Brandwein S，et al. 1998. Experimental models to study molecular mechanisms underlying intestinal inflammation. Ann N Y Acad Sci，859：85～95.

Fowell D，McKnight AJ，Powrie F，et al. 1991. Subsets of $CD4^+$ T cells and their roles in the induction and prevention of autoimmunity. Immunol Rev，123：37～64.

Gilhus NE. 2009. Autoimmune myasthenia gravis. Expert Rev Neurother，9（3）：351～358.

Hutchings P，Hedlund G，Dawe K，et al. 1999. Effect of the synthetic immunomodulator，Linomide，on experimental models of thyrioditis. Immunology，96：340～347.

Islam MS，Loots du T. 2009. Experimental rodent models of type 2 diabetes. Exp Clin Pharmacol，31（4）：249～261.

Joachim，Ricarda A，Quarcoo D，et al. 2003. Stress enhances airway reactivity and airway inflam-mation in an animal model of allergic bronchial asthma. Psychosomatic Medicine，65（5）：811～815.

Kenyon NJ，Ward RW，McGrew G，et al. 2003. TGF-β Causes Airway Fibrosis and Increased Collagen Ⅰ and Ⅲ mRNA in mice. Thorax，58（9）：772～777.

Kieseir BC，Storch MK，Archelos JJ，et al. 1999. Effector pathways in immune mediated central nervous system demyelination. Curr Opin Neurol，12：323～336.

Kohno T，Tsuji T，Hirayama K，et al. 2005. A novel immunomodulator，FTY720，prevents development of experimental autoimmune myasthenia gravis in C57BL/6 mice. Biol Pharm Bull，28（4）：736～739.

Lira SA，Martin AP，Marinkovic T，et al. 2005. Mechanisms regulating lymphocytic infiltration of the thyroid in murine models of thyroiditis. Crit Rev Immunol，25（4）：251～262.

Lock C，Hermans G，Pedotti R，et al. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. Nat Med，8：500～508.

Martino G，Adorini L，Rieckmann P，et al. 2002. Inflammation in multiple sclerosis：the good，the bad，and the complex. Lancet Neurol，1：499～509.

Matsunaga H，Hokari R，Kurihara C，et al. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate the severity of ileitis in the senescence accelerated mice（SAM）P1/Yit mice model. Clin Exp Immunol，158（3）：325～333.

Mayo S，Quinn A. 2007. Altered susceptibility to EAE in congenic NOD mice：Altered processing of the encephalitogenic MOG 35-55 peptide by NOR/LtJ mice. Clinical Immunol，122：91～100.

Ostanin DV，Bao J，Koboziev I，et al. 2009. T cell transfer model of chronic colitis：concepts，considerations，and tricks of the trade. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol，296（2）：G135-146.

Richerson HB. 1972. Acute：experimental hypersensitivity pneumonia in the guinea pigs. Clin Med，79（5）：745～757.

Song S, Crow AR, Freedman J. 2003. Monoclonal IgG can ameliorate immune thrombocytopenia in a murine model of ITP: an alternative to IVIG. Blood, 101 (9): 3708～3713.

Song S, Crow AR, Siragam V. 2005. Monoclonal antibodies that mimic the action of anti-D in the amelioration of murine ITP act by a mechanism distinct from that of IVIg. Blood, 105 (4): 1546～1548.

Szelenyi I. 2000. Animal Models of Bronchial Asthma. Inflarma Res, 49: 639～654.

Wang SH, Chen GH, Fan Y, et al. 2009. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand inhibits experimental autoimmune thyroiditis by the expansion of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells. Endocrinology, 150 (4): 2000～2007.

Waserman S, Olivenstein R, Renzi PM. 1992. The relationship between late asthmatic responses and antigen-specific immunoglobulin. J Allergy Clin Immunol, 90: 661～669.

Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, et al. 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. Nat Protoc, 2 (3): 541～546.

第三十一章　感染性疾病动物模型

免疫学是人类与天花等传染病的斗争过程中发展起来的生命学科。病原体对机体的感染以及机体的免疫力之间有着密切的关系，机体因为缺乏免疫力而感染病原体；相反，病原体感染机体后，机体产生的免疫力具有抵抗、控制或清除病原体的能力。因此，研究机体抗感染免疫以及病原体对机体的侵害都需要实验研究模型即感染性或传染性疾病动物模型，以借此寻找发病机制或发现病因。很多病原体表现出明显的宿主特异性，仅能引起相关物种的疾病，但动物模型仍然是近似模仿人类传染病并找出病因的基础。本章介绍实验室常用的传染性疾病动物模型，了解不同病原体感染动物的饲养和管理时的注意事项，特别是对人畜共患的病原体，必须小心避免实验室人员及动物饲养人员的感染。

第一节　小鼠利什曼原虫感染模型

杜氏利什曼原虫是一种专营寄生生活的单细胞低等真核生物，其生活史包括寄生于媒介昆虫（白蛉）消化道内的前鞭毛体期和寄生于脊椎动物单核吞噬细胞内的无鞭毛体期，能引起严重危害人类健康的内脏利什曼病。利什曼原虫的生命周期包括白蛉和脊椎动物体内两个寄生阶段：前鞭毛体在白蛉消化道内的生长发育；后发育期的前鞭毛体进入哺乳动物宿主皮肤，被巨噬细胞摄取，在吞噬体内转化成为无鞭毛体并复制，裂解巨噬细胞后可侵入其他巨噬细胞，或通过叮咬进入白蛉体内转化回前鞭毛体。每个阶段都可用于制备感染动物模型。

建立利什曼原虫感染模型时，利什曼原虫接种物可选用原虫的无鞭毛体或后发育期前鞭毛体，如新鲜分离或冷藏的 *L. major* 或 *L. donovani* 稳定培养的无鞭毛体。但由于后发育期的原虫体外生长不仅在不同的种系之间有明显差异，即使在同一品系内，也受传代培养的次数、生长条件的影响。因此，感染动物所需的前鞭毛体接种物应尽量采用纯化的后发育期前鞭毛体而减少差异。在 *L. major* 和 *L. donovani* 的固定培养物中，由于后发育期前鞭毛体不被花生凝集素凝集，因此通过花生凝集素凝集实验纯化不被凝集的后发育期前鞭毛体。

本节首先介绍利什曼原虫的复苏、感染、分离、纯化和冻存方法，然后介绍如何用花生凝集素凝集实验分离后发育期前鞭毛体，最后介绍利什曼原虫感染模型的制备。

在原虫感染小鼠之前、同时或之后用不同药物处理小鼠，最后检查小鼠各器官中原虫的数量，对各感染器官进行免疫学或病理学检查等，可了解药物对原虫在各器官中繁殖的影响以及各感染器官的免疫学或病理学变化。

一、利什曼原虫无鞭毛体的复苏、感染、分离、纯化和冻存

由于原虫前鞭毛体具有异质性，可通过用原虫感染小鼠组织、分离感染组织中的无鞭毛体组分并纯化后解决前鞭毛体的异质性问题，同时可以按实验所需进行扩增和冻存。

L. major 或 *L. donovani* 的无鞭毛体或前鞭毛体可购于 ATCC，或新鲜分离，或为冻存的稳定培养物（需先复苏）。原虫经体外扩增培养后接种小鼠足垫（可按表 31-1 选取适当的小鼠品系和接种方式）体内感染扩增，再分离纯化原虫，计数后用于实验或冻存备用。

材料与试剂

BALB/c 小鼠

37℃预温的 RPMI-1640 培养液

199 完全培养基

1.75%（体积比）碘溶液

70%（体积比）乙醇

PBS 包含 2mmol/L EDTA 和 50mmol/L 葡萄糖

DMEM 培养基或 Hank's 液（HBSS），不加 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$

5mg/ml 二乙酸荧光素（FDA；Sigma）丙酮液（4℃稳定 6 个月）

20μg/ml 碘化丙啶（PI；Sigma）PBS 液

2×冷冻保存液：混合 20ml 热灭活胎牛血清，15ml 二甲基亚砜（DMSO），65ml RPMI-1640 培养液。4℃可保存 2 周

研钵，灭菌的玻璃纤维，灭菌的 15ml 聚丙烯离心管，75cm² 培养瓶，26℃无 CO_2 培养箱

步骤

1）从液氮中取出冻存的原虫立即放入 37℃水浴中，轻轻摇晃至完全融化，70%乙醇消毒冻存管表面。

2）将原虫悬液加入灭菌的 15ml 聚丙烯离心管中，加入 10ml 37℃预温的 RPMI-1640 培养液，以滴入方式轻轻混匀。4℃或室温下 3000*g* 离心 15min，弃上清。

3）轻敲小管，重悬原虫于 10ml 199 完全培养基，加入 75cm² 培养瓶中，26℃无 CO_2 培养箱中培养（如果解冻的无鞭毛体经过活力检测，也可直接用于感染动物）6d。

4）取 BALB/c 小鼠，表面消毒足垫后接种 40～50μl 含 1×10^5～1×10^7 个表皮种属的原虫（*L. major*、*L. mexicana* 或 *L. amazonensis*）。4～6 周后，在形成溃疡前脱颈处死小鼠。表面消毒足垫，浸泡足垫于 1.75%碘溶液 10min，然后浸泡足垫于 70%乙醇 10min，蒸馏水清洗。

5）分离皮肤和皮下损伤组织，无菌切除感染组织，置于盛有 3～5ml 含 2mmol/L EDTA 和 50mmol/L 葡萄糖 PBS 的研钵中，研磨感染组织，匀浆至大多数宿主

细胞破裂，或用匀浆器匀浆组织。

6）用装有少量无菌玻璃纤维的 5ml 注射器过滤所得匀浆液，4℃下 200g 离心 10min 去除细胞碎片。重悬无鞭毛体于 50ml DMEM 或 HBSS 中，4℃下 3000g 离心 15min，去上清。沉淀物用少量 DMEM 或 HBSS（1～5ml）重悬。

7）新鲜制备的 FDA 工作液：10ml 的 PBS 中加 0.04ml 5mg/ml 的 FDA 液。

8）取 0.1～1.0ml 原虫悬液，加入 0.1ml FDA 工作液（2μg）和 0.03ml 的 20μg/ml的 PI（0.6μg）。染色 3min 后用荧光显微镜计数，交替使用绿色（可见光）和红色（不可见光）过滤片观察和计数标记原虫（一个足垫可收集到约1×10^8 个无鞭毛体）。

9）调整浓度为 1×10^7 个/ml～5×10^7 个/ml，直接用于接种或冷冻保存。

10）冷冻保存时收集对数生长（培养 2～3d）的前鞭毛体培养物，4℃下 1500g 离心 10min，去上清，振动管子轻轻打散原虫后加入冷 RPMI-1640 配成 5×10^7 个/ml的浓度。

11）以滴入方式加入等体积的 2×冷冻保存液后，分别取 1ml 悬液加入预先标记的冷冻管中，置冰上 15min。将冷冻管转移到－70℃冰箱放置过夜后，液氮中保存。

二、花生凝集素凝集实验纯化利什曼原虫后发育期前鞭毛体

纯化的后发育期前鞭毛体是制备感染动物模型的常用接种物。根据后发育期前鞭毛体不被花生凝集素凝集的特点，通过花生凝集素凝集实验可分离纯化可被凝集的非后发育期前鞭毛体和不被凝集的后发育期前鞭毛体。

材料与试剂

新鲜分离或冷藏的 *L. major* 或 *L. donovani* 稳定培养的无鞭毛体或前鞭毛体

199 完全培养基

DMEM 或 HBSS，不加 $CaCl_2$ 或 $MgCl_2$

5～10mg/ml 花生凝集素（PNA）

25～75cm^2 组织培养皿，26℃无 CO_2 培养箱

步骤

1）在培养瓶中加入 10ml 199 完全培养基，接种 1×10^7 个原虫，26℃无 CO_2 培养箱中培养 6d。

2）根据所需后发育期原虫的数量，将上述已处于对数生长的原虫接种到含 50～100ml 199 完全培养基的组织培养瓶中扩增培养 1～2d。

3）收集培养液：在 50ml 离心管中，4℃下 3000g 离心 15min，洗涤 2 次。重悬于 DMEM 或 HBSS 中并计数，配成 1×10^8～2×10^8 个/ml，按 1：100 的量加 20%（体积比）丙三醇用于保存活力。

4）加终浓度为 50～100μg/ml 的花生凝集素，室温孵育 15～30min，4℃下 200g 离心 5min。收集悬浮液后按步骤 3）洗涤 2 次，即为不被凝集的后发育期前鞭毛

体，最后以少量体积 DMEM 或 HBSS 重悬细胞，计数后配成合适浓度以供再培养、接种或冻存。

注意事项

步骤 4）的低速离心可分离凝集的非后发育期前鞭毛体（沉淀）和不被凝集的后发育期前鞭毛体（悬浮液）。

三、皮肤感染利什曼原虫的小鼠模型

皮肤利什曼原虫病实验模型可采用 BALB/c、DBA/1、DBA/2、CBA、C3H、A/J、AKR、NZB、C57BL 等近交系小鼠，但其遗传易感性有较大的差异（表 31-1），此模型已被很多实验室用以分析机体抗感染能力、对感染易感性的免疫机理以及药物对机体免疫功能的影响。

表 31-1 利什曼原虫菌株经皮肤或内脏感染近交系小鼠的结果

宿主[a]	利什曼原虫菌株			
	L. major[b]	*L. mexicana*[b]	*L. braziliensis*[b]	*L. donovani*[c]
C57BL	痊愈	慢性	ND	急性易感/治愈
BALB/c	进行性	进行性	无损伤	急性易感/未治疗
DBA/1	慢性	ND	ND	急性易感
DBA/2	慢性	无损伤	ND	急性抵抗
CBA	痊愈	ND	ND	急性抵抗
C3H	痊愈	痊愈	ND	急性抵抗
A/J	痊愈	痊愈	ND	急性抵抗
AKR	痊愈	ND	ND	急性抵抗
NZB	痊愈	ND	ND	急性抵抗

a. 小鼠通常不是 Viannia 亚属原虫（包括 *L. braziliensis*、*L. panamensis*、*L. guyanensis*）的致病宿主，但 Viannia 亚属与美洲的大多数皮肤和黏膜疾病有关。

b. 感染方式：表皮和真皮下接种 $1\times10^4\sim1\times10^7$ 个原虫。

c. 感染方式：静脉内接种 $1\times10^6\sim1\times10^7$ 个原虫。

ND：未知。

原虫感染的小鼠模型是将无鞭毛体期的原虫接种于小鼠的皮肤（大多用足垫接种）或静脉接种，在接种前后对小鼠进行药物处理，然后检测感染部位和感染器官中原虫的数量，从而判断药物的效应。以下以原虫接种小鼠足垫为例，介绍具体方法。

材料与试剂

利什曼原虫接种物为新鲜分离或冷藏的、经稳定培养的 *L. major* 或 *L. donovani*，无鞭毛体或前鞭毛体（可购于 ATCC，其扩增、分离及保存方法见后）

DMEM 或 HBSS，不加 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$

199 完全培养基

游标卡尺

1.5ml Eppendorf 管（高压灭菌，提前称重）

1.5ml 聚丙烯微量离心管研磨棒（一次性，灭菌）

去纤维蛋白兔血

NNN 培养基（三氮培养基：诺-尼-麦三氏细菌培养基，含琼脂、盐、兔血）

26℃培养箱，43℃水浴箱，3～5mm 玻璃珠，96 孔平底培养板

步骤

1）制备血液琼脂培养板：微波炉融化 NNN 培养基 70ml，在水浴中降温到 43℃；取 30ml 预温 43℃的去纤维蛋白兔血与 NNN 培养基混合。将 96 孔板倾斜 70°，加入混合液 50μl/孔，盖上盖子，paraflim 膜封口或放于加湿盒中（4℃可保存 6～8 周）。

2）将原虫接种物溶于 DMEN 或 HBSS 中，配成所需浓度（1×10^5～1×10^7 个/ml）。

3）将小鼠固定（亦可浅麻醉后固定）后，足垫注射含有原虫的悬浊液 40～50μl。

4）定时观察足垫肿胀情况：固定动物（不麻醉），用游标卡尺在第五趾尖底部测量足垫的宽度和厚度（mm^2），以对侧未接种足垫作为对照。结果为足垫厚度、宽度的增加值（或评分）表示。

5）取接种侧腹股沟引流淋巴结或脾脏，制成单细胞悬液（参见第一章），重悬于 10ml（脾脏）或 1ml（淋巴结）199 完全培养基中。取足垫：表面消毒感染侧足垫，按上述（原虫无鞭毛体的复苏、感染、分离、纯化和冻存）步骤 4）～5）方法，取下 1～10mg 组织放入灭菌、提前称重的含有 0.3ml 199 完全培养基的 Eppendorf 管内，盖上盖子翻转或轻敲管子使组织沉于底部，不使组织脱水。用研磨棒研磨淋巴结、脾脏或足垫组织成匀浆。

6）取 100μl 组织匀浆或脾脏或淋巴结匀浆，用 199 完全培养基进行倍比稀释。将不同稀释度的匀浆 100μl 接种至灭菌的血液琼脂培养板中。密封培养板，26℃、无 CO_2 条件下培养 7～10d（倍比稀释后可先在 96 孔板上培养，然后转移至血液琼脂培养皿培养）。

7）倒置显微镜下计数前鞭毛体。如果血琼脂板影响直接观察，可取少量液体于载玻片或 96 孔板上进行计数。计算整个淋巴结或脾脏原虫数量，也可计算每毫克足垫组织的原虫数量，即原虫可生长的最高稀释度/组织重量。

注意事项

1）小鼠模型的疾病过程及结果除了遗传背景外，可受接种的原虫剂量、接种途径及部位、原虫致病力的种内差异等影响，因此，作为体内致病力的对比，需用特定期（后发育期前鞭毛体）的原虫感染。

2）称重离心管后研磨组织时应避免将手术剪刀同组织一同浸入培养基，以免带走一定体积的溶液后造成组织称重不准确。

3）利什曼原虫对人具有中度潜在危害，因此在操作时，必须在生物安全二级装置中进行，特别是接种实验动物时最可能发生实验室感染，应该注意防护。

第二节　小鼠弓形虫感染模型

不同动物或不同品系的小鼠对不同株弓形虫 *T. gondii* 的敏感性不同。RH 株初次

感染小鼠时，均有强烈的致病性及致死率。但 ME49 等虫株毒性较低，对小鼠无致死作用，因此被很多实验室用来研究机体对 *T. gondii* 弓形虫的免疫反应。本节首先介绍 *T. gondii*的扩增和保存方法，然后介绍 *T. gondii* 的各种感染模型的建立方法，最后介绍 *T. gondii* 感染的评估方法。

在 *T. gondii* 感染小鼠之前、同时或之后用不同药物处理小鼠，最后评估感染进展和（或）机体免疫应答状态等，可了解药物对 *T. gondii* 感染的影响以及各感染器官的免疫学或病理学变化。

一、用人类包皮成纤维细胞扩增 *T. gondii* 速殖子

材料与试剂

人类包皮成纤维细胞（HFF；Hs68；ATCC ＃CRL 1635）

T. gondii RH 株速殖子（ATCC ＃50174）或 ts-4 株速殖子（ATCC ＃40050）

含 10％热灭活 FBS 的完全 DMEM 培养液（10×DMEM 培养液）

组织培养瓶，细胞刮，37℃或 33℃培养箱

步骤

1）用 10-DMEM 培养液常规培养 HFF 细胞。待细胞长满瓶底 90％时，加入 *T. gondii* 速殖子至 1×10^{6} 个/ml（此剂量速殖子在 2d 内可明显溶破 HFF 细胞层）。

2）37℃孵育（RH 株）或 33℃孵育（ts-4 株），倒置相差显微镜观察单细胞层中成纤维细胞内病原体复制形成的玫瑰花结构。

3）当大多数 HFF 细胞内含大量速殖子时，用细胞刮破坏单细胞层以释放病原体。

4）直接用速殖子进行建立动物模型，或取 1/10 速殖子培养物加入其他 HFF 单细胞层传代 RH 速殖子。不需要最佳活力病原体时（如制备 *T. gondii* 融胞产物抗原时），破坏单细胞层后，收集含有速殖子的培养基。

二、ME49 包囊种子库的维持和保存

T. gondii 只能在动物体内传代，所以原种只能从保存有 *T. gondii* 虫株的单位获赠。得到原种后，可自己维持和保存。以下以 ME49 株为例介绍包囊种子库的维持和保存方法。

反复传代 *T. gondii* 包囊可增加病原体的毒性，应该尽量避免。ME49 株中某些小鼠中形成慢性感染并不致死小鼠，所以可将该小鼠作为种子库“长期”培养 ME49 株。通常用 Swiss-Webster 小鼠作为种子库保存 ME49 包囊（ME49 株包囊在 Swiss-Webster 小鼠中传代 1 年内只能 1 或 2 次，以免毒性增加）。用 C57BL/6 或 CBA/Ca 小鼠作为实验动物，或作为进一步扩增包囊的载体以获得足够的包囊用来试验。

材料与试剂

无病原体 Swiss-Webster 小鼠，C57BL/6 小鼠或 CBA/Ca 小鼠（6～8 周龄）

含有 *T. gondii* ME49 株包囊的小鼠大脑。

步骤

1）种子库的维持：取10～20只Swiss-Webster小鼠，每只腹腔内注射含有10～20个 *T. gondii* ME49株包囊的小鼠大脑组织。此小鼠可长期饲养。
2）包囊的扩增：在用ME49包囊前至少4周，处死1只经 *T. gondii* ME49株感染至少1个月的Swiss-Webster小鼠，取脑制备包囊悬液（方法见下述：小鼠全身性急性弓形虫 *T. gondii* 感染模型）。每个Swiss-Webster小鼠脑能获得ME49包囊300～1000个。
3）取C57BL/6小鼠或CBA/Ca小鼠，腹腔内注射含10～20个包囊的Swiss-Webster小鼠脑组织，饲养小鼠4周。每个C57BL/6小鼠脑能获得ME49包囊700～1100个，每个CBA/Ca小鼠脑能获得3000～4000个。
4）同法制备C57BL/6小鼠或CBA/Ca小鼠脑组织匀浆，用于实验。

注意事项

通常从1只Swiss-Webster小鼠脑中获得的ME49包囊已足够实验，不必扩增。必要时才在C57BL/6小鼠或CBA/Ca小鼠中扩增ME49包囊。

三、小鼠全身性急性 *T. gondii* 感染模型

小鼠品系和感染途径对感染结果至关重要（表31-2），接种物规格、剂量也可显著影响某种近交系小鼠对 *T. gondii* 的易感性。

表31-2　接种 *T. gondii* ME49株弓形虫包囊对不同种系小鼠的易感性

小鼠种系	急性感染		慢性感染（弓形虫脑炎）
	口服	腹腔内	
C57BL/6	易感	抗药	易感
BALB/c	抗药	易感	抗药
CBA/Ca	未知	抗药	易感

材料与试剂

T. gondii ME49株慢性感染（1个月以上）的雌性小鼠（C57BL/6或CBA/Ca）（见后）
70％乙醇
PBS，pH2.0
手术器械，研钵和研棒，带22G针头的1ml或3ml注射器，18G 3.8cm长的强饲针

步骤

1）处死 *T. gondii* 感染小鼠，用70％乙醇清洗头部。切开皮肤暴露颅骨，用手术器械打开颅骨，暴露大脑，取出大脑组织置于无菌研钵中研磨。
2）研磨脑组织后加入1ml PBS，用带22G针头的3ml注射器反复吹吸悬液进行匀浆。

3）取 20μl 样品滴于载玻片上（每份 3 片），盖上盖玻片，100 倍显微镜下观察，计数整张玻片中的包囊数。计算 3 张玻片的平均包囊数，换算出每毫升脑悬液中的包囊数。用 PBS 把匀浆液中的包囊稀释至所要求的浓度（50～500 个包囊/ml）。

4）腹腔内感染：清洁级雌性 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.2ml 的脑组织匀浆液（含 10～20 个包囊）。

5）口服消化道感染：用 18G 强饲针将 0.2ml 包囊悬液给予清洁级雌性 C57BL/6 小鼠（一般喂饲 10～100 个包囊）。

6）评估感染进展和/或机体免疫应答（见后）。

注意事项

1）*T. gondii* 是生物安全二级的病原体，接触这种微生物时，应该遵守适当的预防措施。

2）在体外应严格无菌操作。

3）BALB/c 与 CBA/Ca 小鼠对 *T. gondii* 的易感性不同，所接种的包囊数越多，差异就越明显。有文献显示腹腔内感染 20 个、40 个或 80 个包囊后，BALB/c 小鼠分别有 12%、50%、75%在 3 周内死亡，而 CBA/Ca 小鼠在相应时间内则没有观察到死亡。

四、小鼠慢性 *T. gondii* 脑炎模型

小鼠品系对感染结果至关重要（表 31-2），通常用 C57BL/6 或 CBA/Ca 作为 *T. gondii*感染脑炎的动物模型。

材料与试剂

无病原体雌性 6～8 周易感种系小鼠

PBS，pH7.2

甲氧氟烷

带有 22G 针头的 30ml 注射器

步骤

1）用含 10～20 个 ME49 包囊的脑组织经口服或腹膜下感染易感种系小鼠。

2）在感染后 4 周和 8～10 周临床评估小鼠的感染状态（见 *T. gondii* 感染进展和免疫应答的评估）。用甲氧氟烷麻醉小鼠。

3）如上述方法（急性感染模型）取出大脑，然后评估弓形虫脑炎进展情况（见 *T. gondii*感染进展和免疫应答的评估）。评估一个以上的参数，确定慢性弓形虫脑炎。

五、重症联合免疫缺陷小鼠 *T. gondii* 感染模型

由于重症联合免疫缺陷小鼠（SCID）缺少 T 细胞和 B 细胞，用 ME49 感染小鼠在 2～3 周后即死亡。为了制备慢性感染模型，可给予磺胺嘧啶，磺胺嘧啶停药后可造成感染的重新加重并死亡。此模型模仿弓形体脑炎在免疫宽容个体的发病机制，也可通过

回输 T 细胞或其他细胞给 SCID 鼠来研究这些细胞对 *T. gondii* 的免疫应答。

材料与试剂

无病原体感染的雌性 C. B-17S SCID 小鼠（6～8 周龄）

磺胺嘧啶

Naive 小鼠淋巴细胞单细胞悬液

T. gondii 免疫动物或 ME49 慢性感染（1 个月以上）的 BALB/c 小鼠

步骤

1）SCID 小鼠（层流罩内操作）经口服或腹腔给予 10～20 个 ME49 包囊感染小鼠。饲养小鼠于层流柜，自动喂饮高压灭菌的食物和水。

2）慢性感染模型：感染后 3～10d 开始用磺胺嘧啶喂饲动物（200mg/L 饮用水），持续 3 周（停止应用磺胺嘧啶后，死亡率取决于感染后起始给药的时间；给药越早存活时间越长，如感染后 3d 给药可存活 3 周）。

3）细胞过继试验：停止给磺胺嘧啶（再活化慢性感染模型）1d 前，静脉或腹腔给予 1×10^7～5×10^7 个的 Naive 小鼠或 *T. gondii* 免疫小鼠的淋巴细胞单细胞悬液。

4）评估感染进展和（或）机体免疫应答。

六、*T. gondii* 感染进展和免疫应答的评估

根据试验目的，选择以下一个或多个合适的参数进行评估。

（一）临床评估

每天检测动物，记录疾病体征（竖毛、蜷缩成团、呼吸急促）、死亡率和存活时间（研究弓形体脑炎时，应需特别注意检查感染后 4～10 周的体征）。

（二）包囊数目评估弓形体脑炎

免疫健全小鼠感染后 4～10 周或 SCID 小鼠在磺胺嘧啶停药后隔周测定脑包囊数来判定感染。感染小鼠的大脑组织一半用 PBS 制备匀浆。取 20μl 样品滴于载玻片上（每份 3 片），盖上盖玻片，100 倍显微镜下观察，计数整张玻片中的包囊数。计算 3 张玻片的平均包囊数，换算出脑组织中的全部包囊数。另一半脑组织用于病理学检查。

（三）组织病理学和免疫组织化学检测

1）*T. gondii* 急性感染模型：感染后第 1 周的不同时间，处死小鼠，取出肝、肺、心、大肠、小肠和肠系膜淋巴结（特别是消化道感染情况下）做组织病理学检查。

2）弓形虫脑炎模型：感染 4～10 周后处死小鼠取大脑组织。SCID 小鼠慢性感染模型，在磺胺嘧啶停药后要每周处死小鼠取大脑组织。

3）所取部分器官在福尔马林固定液中室温固定过夜，每种器官制备 2～4 份 5μm 厚的组织切片（间隔 50～100μm）。

4）苏木精/伊红染色标本，观察炎性改变。用抗 *T. gondii* 多克隆抗体对 *T. gondii*

及其抗原进行免疫组化检测。检测含有 *T. gondii* 的空泡数量。

注意事项

其他器官像脑、脾脏、肾脏在急性感染阶段表现较弱的炎症反应。ME49 急性感染 SCID 小鼠的器官应在感染 2 周后收集，一般在感染后 14～18d，心脏、肝脏和肾脏可检出炎症反应。

七、RT-PCR 检测 *T. gondii* 表面抗原-1（SAG-1）和 SAG-2 的 mRNA

1）*T. gondii* 急性感染模型：感染后 7d 取肝脏和肺脏等组织；*T. gondii* 脑炎模型：感染后 4～10 周取脑。

2）匀浆组织并分离 mRNA：半定量逆转录 PCR（RT-PCR），根据速殖子阶段基因特异性表达的 mRNA［SAG-1 和（或）SAG-2］水平来评价原虫感染情况。按照以下的 PCR 程序用 SAG-1 和 SAG-2 引物和寡核甘酸引物进行扩增，根据预试验决定循环次数。引物和探针为：

SAG-1　引物正义链：5′-ATGTCGGTTTCGCTGCACTTC-3′（311～334）；引物反义链：5′-TCACGCGACACAAGCTGCGATAGAGCC-3′（1295～1321）；探针：5′-GCTAGTCTCGACACGGCAGGC-3′。

SAG-2　引物正义链：5′-ATGAGTTTCTCAAAGACCACGAGCCTAGC-3′（182～210）；引物反义链：5′-TTACACAAACGTGATCAACAAACCTGCGAGA-3′（710～742）；探针：5′-CGAGGAAGTTGACGACTGTCC-3′。

八、ELISA 或 RT-PCR 法检测细胞因子来评估 *T. gondii* 急性感染或慢性脑炎

急性弓形体感染可通过检测感染后 1 周内不同时间血浆细胞因子水平来判定。感染前后尾静脉取血，可处死动物收集血浆样品，并在感染 1 周时取腹腔灌洗液。可用 ELISA 法检测 IFN-γ、TNF-α、IL-12 等细胞因子水平；也可收集感染后不同时间的各种组织如脾、肝、肺和腹腔细胞，提取 RNA 后采用 RT-PCR 检测 IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4、IL-10、IL-12p35 和 IL-12p40 的 mRNA 表达。细胞因子分泌和 T 细胞增殖反应可用 *T. gondii* 抗原（速殖子或原虫溶解物）体外刺激脾细胞或腹腔细胞后测定，并用 ConA 作对照。弓形虫脑炎在感染后 4～10 周时可通过检测脑组织表达这些因子 mRNA 的水平来判定。具体检测方法见相关章节。

第三节　小鼠巨细胞病毒感染模型

病毒性疾病一直是临床治疗的难点，因此建立病毒感染动物模型，研究病毒与机体相互作用的发展和转归规律，以及研究不同处理对病毒性疾病的治疗作用及其机理是医学研究的热点和重点之一。巨细胞病毒（CMV）感染的小鼠是研究人类病毒感染，特别是巨细胞病毒感染的良好模型。

巨细胞病毒具有严格的种属特异性，所以不能用人的 CMV 感染动物。通过建立的啮齿动物的巨细胞病毒（如小鼠、大鼠和豚鼠）模型体系，来认识人巨细胞病毒疾病并能解决很多临床研究中的问题。

制备巨细胞病毒感染的小鼠模型，首先要能获得、繁殖、纯化和滴定 CMV。很多细胞系适合用于繁殖 CMV 病毒，但小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）容易培养、生长快速，更适合繁殖病毒。因此，本节在介绍 CMV 和唾液腺病毒（SGV）感染小鼠模型的同时，还介绍病毒的繁殖、纯化和滴定方法，以及 MEF 细胞的获取方法。

病毒的滴定方法为空斑形成实验，因此病毒的滴度（即病毒的量）以空斑形成单位（plaque forming unit，pfu）表示，1pfu 代表 1 个感染性病毒。

一、巨细胞病毒感染小鼠模型

由于小鼠 CMV 在小鼠间极易传播感染，因此不但动物的喂养应该在 SPF 的环境中，且感染 CMV 的小鼠要进行分离喂养，以防止实验组和对照组之间的病毒交叉感染。

小鼠 CMV 对人类无感染性，因此可在普通实验室操作该类病毒，只要注意无菌操作即可。

在病毒感染小鼠之前、同时或之后用不同药物处理小鼠，最后检查小鼠各器官中病毒的滴度，对各感染器官进行免疫学或病理学检查等，可了解药物对病毒在各器官中复制的影响以及各感染器官的免疫学或病理学变化。

材料与试剂

BABL/c 小鼠（新生或成鼠）或其他品系

纯化的鼠巨细胞病毒（mCMV）或唾液腺病毒（SGV）

完全培养基：含 10%胎牛血清、2mmol/L L-谷氨酰胺、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素、0.2mg/ml 庆大霉素和 2.5μg/ml 两性霉素 B 的 DMEM 培养液

0.45mm 钢网

步骤

1）感染新生小鼠：用 100pfu 纯化鼠 CMV 或 SGV 腹腔注射，感染新生 BABL/c 小鼠。

2）感染成鼠：用纯化的 1×10^5pfu 鼠 CMV 或 SGV 腹腔注射、皮下（足垫）注射或者静脉注射感染 BABL/c 成鼠。

3）分别在 7d、14d、21d 时处死感染小鼠，取器官（如唾液腺、脾、肝）后−70℃冻存，以备病毒滴度的测定。

4）在 0.45mm 钢网上研磨所取的器官，收集匀浆产物，用完全培养基冲洗钢网并收集洗脱液，总体积约为 5ml。

5）立即用细胞空斑形成试验检测组织匀浆稀释液中鼠 CMV 滴度。

注意事项

1）成功感染新生小鼠至少要用 100pfu 病毒，但用 1000 pfu 病毒感染会引起严重的

疾病，如发育不全、脱毛、生长停止和高死亡率。

2）SGV 毒性高，对成年 BABL/c 小鼠的 LD_{50} 约 1×10^5 pfu，此剂量 SGV 会引起小鼠发生严重的合并肝炎。

3）脾、肝脏、肺中病毒滴度峰值出现在感染小鼠后的 11～14d，唾液腺中病毒滴度峰值出现较内脏器官晚一些。

二、小鼠胚胎原代成纤维细胞的制备

小鼠胚胎原代成纤维细胞（MEF）可获于不同品系的小鼠胚胎，均对 CMV 敏感。

材料与试剂

孕鼠

无钙镁 PBS

胰蛋白酶溶液：0.25%（质量体积比）胰蛋白酶溶解于 PBS 中，并含 1mmol/L EDTA

完全培养基（见本节上述）

无菌手术器械，500ml 无菌的锥形瓶，2～4mm 无菌玻璃球，无菌纱布或 0.45mm 不锈钢网，175cm^2 组织培养瓶，37℃，5% CO_2 培养箱

步骤

1）脱颈处死怀孕 17～18d 的小鼠，取出胚胎，尽可能取出胚胎的肝和肠。

2）在培养皿中无菌剪碎胚囊，用 PBS 冲洗组织块，去除红细胞和细胞碎屑。把 5～8 个胚囊的组织块转移到 500ml 无菌的锥形瓶中，组织块基本铺满瓶底。加入 30ml 的胰蛋白酶溶液，无菌磁力搅拌，将能覆盖瓶底 1～2 层的量的无菌玻璃球加入锥形瓶中。37℃慢慢磁力搅拌 30min。

3）加 30ml 的胰蛋白酶和 10ml PBS 到组织块中。37℃搅拌 30min。再重复一次（总共 3 次加入胰蛋白酶并搅拌）。

4）用 2～3 层无菌纱布或 0.45mm 不锈钢网过滤细胞液（110ml）。室温下 250*g* 离心细胞悬液 10min。弃上清，用 10ml 的完全培养基重新悬浮沉淀细胞。

5）用台盼蓝拒染法测定活细胞的比例，并接种 1×10^7～2×10^7 个细胞（50～100ml）于 175 cm^2 组织培养瓶中，在 37℃，5% CO_2 培养箱中孵育过夜。

6）除去培养基和细胞碎屑，添加新鲜的培养基，继续孵育 2d 以上。

7）当细胞长到汇合（连成一片）时，用胰蛋白酶溶液消化细胞。经 PBS 洗涤细胞后，按 1∶3 的比例传代培养，第 4 代可用于繁殖病毒。冻存原代或传代的细胞（每个培养瓶分成 9 份）于液氮中，可稳定地保存一年。

注意事项

1）过量的胰蛋白酶能降低细胞的生存能力，但胰蛋白酶消化不足会降低细胞的得率。

2）在添加新鲜胰蛋白酶到组织块中前，可先过滤和离心去上清；用此方式经过 3 次的胰蛋白酶消化可提高细胞的得率。

三、巨细胞病毒的制备与纯化

小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）适合繁殖 CMV，但原代细胞需传到第 4 代才能用于繁殖病毒。一些 MEF 细胞株也能用于繁殖 CMV。

感染培养细胞时可用非纯化的病毒，而感染小鼠则需要用纯化的病毒。

材料与试剂

小鼠巨细胞病毒（mCMV）：Smith 株（ATCC # VR-194，VR-1399）或者 K181 细胞株，用完全培养基配成适当浓度（pfu/ml）

小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）或其他合适的细胞（NIH 3T3，ATCC CRL-1658；BALB/c 3T3，ATCC CCL-163）

完全培养基（见本节上述）

蔗糖/VSB 缓冲液：含 15%（质量体积比）蔗糖，12mmol/L KCl，5mmol/L EDTA 的 50mmol/L Tris · HCl pH7. 8，高压灭菌或过滤除菌，室温可保存 6 个月

165cm^2 组织培养皿

细胞刮

500ml 和 250ml 无菌离心管

Dounce 匀浆器或研磨棒（Wheaton）

0. 45μm 滤菌器

37℃，5% CO_2 孵箱

细胞冻存管

超速离心机（如 Beckman SW28）

20ml 离心管

步骤

1）在组织培养皿中用完全培养基培养 MEF 细胞，每隔 2～3d 按 1∶3 的比例传代，传 3 代。第 4 代细胞培养至铺满培养皿面积的 70%～80%（培养 2～3d）时，吸除大部分培养基，加入 10^5pfu CMV（每个细胞约 0. 01pfu），加入的液体量以正好能完全铺满培养皿底为宜。在 37℃，5% CO_2 孵箱中培养 2h 后添补培养基到 100ml，继续培养 3～5d 至细胞完全感染病毒（培养的细胞大多数变圆）。

2）收集培养液中的未纯化病毒：收集含病毒的培养上清，用细胞冻存管保存病毒液于－70℃（可稳定保存一年）。留部分病毒液用于测定病毒滴度（见本节下述）。

3）收集培养液中及细胞内的未纯化病毒：吹打细胞（必要的时候可用细胞刮刮下细胞），收集细胞及上清。在－20℃和 37℃反复冻融细胞 2～3 次，破碎细胞将细胞内的病毒释放出来。4℃下 2000g 离心 10min，取含病毒的上清。用细胞冻存管冻存病毒液，留部分病毒液用于病毒滴度测定。

4）病毒的纯化。

(1) 预离心：取步骤 2) 收集的含病毒上清，4℃下 6400g 离心 20min。取步骤 3) 收集的含病毒上清，4℃下 20 000g 离心 20min。将上清转移到 250ml 无菌离心管中。

(2) 收集病毒：4℃下 26 000g 离心至少 3h，弃上清。置含少量残余液体的沉淀于冰上，4℃过夜。

(3) 用残留的液体重新悬浮沉淀，冰上匀浆 20 次。把病毒小心加到含有 18ml 蔗糖/VSB 缓冲液的 20ml 超速离心管中，两种液体应清晰分层。4℃下 72 000g离心 1h。

(4) 轻轻地倒掉液体，加入 4ml 蔗糖/VSB 缓冲液，冰上过夜（如有需要可再次匀浆）。

(5) 用 0.45μm 滤菌器过滤悬浮液，除去病毒的壳体及聚合物。

(6) 分装过滤液成 20μl，保存于－70℃（可稳定的保存一年）。留部分过滤液用于测定病毒滴度。

注意事项

1) 细胞培养液中及细胞内的未纯化病毒滴度通常在 2×10^{6} pfu/ml 左右。反复冻融也会裂解细胞中的病毒，降低病毒滴度，因此次数不宜过多。

2) 预离心含病毒上清的目的是除去上清中的细胞碎片。步骤 3) 收集的含病毒上清液中细胞碎片和细胞器较多，所以需较高的离心速度。

3) 纯化后病毒滴度较高（$1\times10^{7}\sim1\times10^{9}$ pfu/ml），但在纯化的过程中病毒的感染力会降低。

四、唾液腺病毒的制备

从唾液腺中制备的病毒（SGV）的毒性比从其他器官和培养细胞制备的病毒的毒性大。

材料与试剂

4～6 周 BABL/c 小鼠或其他品系小鼠

纯化的鼠唾液腺病毒（SGV）

完全培养基（见本节上述）

0.45mm 钢网

匀浆器或研磨棒

步骤

1) BALB/c 小鼠足垫注射 10～20μl 含 2×10^{5} pfu SGV 的组织培养来源的病毒。2 周后处死小鼠收集唾液腺、腮腺、较大的舌下腺和下颌腺。保存腺体于－70℃（可稳定的保存一年）。

2) 用匀浆器或研磨棒匀浆腺体组织：用 PBS 代替完全培养基冲洗钢网，整个过程冰上操作。

3) 测定组织匀浆中的病毒滴度。

4）扩增病毒：用 5×10^4 pfu SGV 经腹腔内感染新小鼠（0.5～1ml）。2 周后从感染小鼠取出腺体，集中每次得到的腺体后再匀浆。4℃下 800*g* 离心 5min。

5）将上清转移到一个新的离心管中，用 3～5ml PBS 重新悬浮沉淀物，再次匀浆和离心。将上清收集到一起，分成 250～500μl 冻存于－70℃（可稳定的保存一年）。取部分上清测定病毒滴度。

五、用空斑形成实验测定巨细胞病毒滴度

采用空斑形成实验测定巨细胞病毒滴度，方法简单，结果可靠，也可用于其他病毒的检测。空斑形成实验的原理是：将系列稀释的病毒液加到培养的单层细胞表面，病毒在细胞中复制并裂解细胞，释放的病毒再感染再裂解周围的细胞，从而在细胞单层上出现缺失细胞的空斑或噬斑。理论上，每个空斑代表病毒液中一个感染性病毒引起的病变，称为空斑形成单位或噬斑形成单位（pfu）。有时会发生多个病毒感染同一个细胞的现象，所以在实验中应尽量稀释病毒液，以免这种现象发生。

材料与试剂

小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）或其他合适的细胞

试验样品：CMV 或 SGV 感染小鼠器官匀浆，未纯化或纯化的小鼠 CMV 保存液等

完全培养基（见本节上述）

黏稠培养基：溶解 8.8g 甲基纤维素到双蒸水中。磁力搅拌器搅拌后，高压灭菌（121℃ 30min）。继续搅拌数小时，直至完全溶解。无菌加入 40ml 10×DMEM 培养液，40ml 胎牛血清，40 000U 青霉素，40mg 链霉素和 4ml 1mol/L HEPES。－20℃可保存 6 个月。由于来自小鼠器官的实验样品被污染的概率较大，所以检测该类样品时，培养基中还应加入 80mg 庆大霉素和 1mg 两性霉素 B

48 孔细胞培养板，培养板离心机，37℃、5% CO_2 培养箱

步骤

1）滴定的前一天接种一定密度的 MEF 于 48 孔细胞培养板中，用完全培养基在 CO_2 培养箱中培养，待测定时细胞应长满孔底的 90%。

2）用完全培养基 10 倍系列稀释病毒：组织器官匀浆 CMV 病毒液从 1/20 稀释开始，然后 10 倍系列稀释。细胞培养产生的 CMV 病毒或 SGV，稀释度从 0.5×10^{-2} 个开始至 0.5×10^{-8} 个。CMV 病毒储存液，从 10^{-3} 个开始至 10^{-10} 个。

3）移去细胞培养液，每孔加入 0.5ml 病毒稀释液，每个稀释度 3 个复孔。CO_2 培养箱中培养 1h，让病毒感染细胞。为增加测定的敏感性，也可将 48 孔细胞培养板 1000*g* 离心 10min 后再培养 1h。

4）移去培养基后，每孔添加 0.5～1.0ml 黏稠培养基。CO_2 培养箱中培养 3～5d。

5）选择病毒噬斑清晰分散的各稀释度孔，在倒置显微镜下计数每孔的全部噬斑，计算出每毫升病毒所形成的病毒噬斑数（pfu/ml）。

注意事项

1）用黏稠培养基覆盖感染细胞的目的是，防止破裂细胞释放的病毒在液相中扩散。

2）首次实验时，样品的稀释度应尽量加大，以达到能清晰分辨噬斑的稀释度。在计数噬斑时，应同时计数上下两个稀释度孔中的噬斑，以增加准确性。

3）在显微镜下，病毒有效感染成纤维细胞后细胞变圆、死亡，形成噬斑。噬斑随着培养时间的延长而增大，所以应在培养的3d后注意观察形成的噬斑，在适当的时间计数噬斑。

第四节　小鼠李斯特菌感染模型

单核细胞增生性李斯特菌是致病微生物，能引起人体严重的疾病，特别是对孕妇、风湿病患者、免疫性疾病患者和接受免疫抑制药物治疗患者。所有接触活菌的操作都要在生物安全2级的实验室（BL-2）中进行。表31-3列出了常用的单核细胞增生性李斯特菌株及其对小鼠的致病力。

表31-3　常用的单核细胞增生性李斯特菌株

细胞株	毒性	提供者/参考资料
43251	高	ATCC[b]
10403s	非常高	Bishop 和 Hinrichs(1987)
43250	低	ATCC[b]
15313	高	ATCC[b]
EGD Sv1/2[a]	高	Kaufmann 等(1986)

a. 不同的实验室小鼠细胞株的敏感性变化较大。

b. American Type Culture Collection。

一、单核细胞增生性李斯特菌株感染小鼠模型

单核细胞增生性李斯特菌可通过口服、皮下、腹腔内、静脉等方式感染小鼠，每种方式都有各自的优缺点。最常用的静脉感染方式的优点包括：①快速引起全身性感染；②从肝脏和脾脏分离出细菌的结果显示，静脉接种引起实质性器官感染的机会大于腹腔内接种引起腹膜炎的机会。实验之前应先了解单核细胞增生性李斯特菌感染不同小鼠品系的近似LD_{50}，感染选定小鼠的剂量只用1/10的LD_{50}。免疫BALB/c小鼠时，每只所用剂量是2000个李斯特菌（10 403s株）。不同品系小鼠对单核细胞增生性李斯特菌的敏感性如表31-4所示。

表31-4　不同品系小鼠对单核细胞增生性李斯特菌的敏感性

敏感小鼠	中间敏感性小鼠	抵抗小鼠
C3H/HeJ		B10. D2
129/J		B10. A
DBA2		B6. PL
CBA/H		SJL/WEHI
BALB/c	(C57BL/6×BALB/c)F_1	C57BL/6

注：数据来自于 Cheers 和 McKenzie(1978)。

材料与试剂

单核细胞增生性李斯特菌（ATCC：1531 株）

无菌的脑、心脏浸剂（BHI）肉汤培养基（Difco）

分光光度计，红外线灯，27G 针头

步骤

1）用无菌 BHI 肉汤培养基 37℃培养单核细胞增生性李斯特菌株，也可用无菌的 BHI 肉汤琼脂平板或胰蛋白胨磷酸盐肉汤进行培养。

2）测定 600nm（A_{600}）的吸光率检测早期对数生长期细菌的生长状态，用 PBS 调整细菌浓度至 1×10^4 个/ml。

3）红外线灯照射小鼠 5～10min，使尾静脉充血。置小鼠于固定装置，用 1ml 注射器和 27G 针头经尾静脉接种 0.2ml 稀释的李斯特菌液（2000 个细菌）。在 BL-2 实验室喂饲小鼠并进行特异性的免疫反应实验或者诱导特异性 T 反应。

4）李斯特菌感染小鼠 7～8d 产生特异的 T 细胞反应。

注意事项

1）由于单核细胞增生性李斯特菌的生长速率和吸光率的差别，确定细菌数量的方法应标准化：用肉汤 37℃培养李斯特菌，每隔 1h 测定 A_{600} 处的吸光度（OD），连续测定 6～8 次。每个时间点，用 PBS 系列稀释培养物，接种在无菌肉汤琼脂平皿上培养 24h，计数平皿上的细菌克隆数并换算成每毫升培养物中李斯特菌的数量。比较平皿计数的细菌数/ml 与 A_{600} 数值，可得到 A_{600} 处的 OD 值代表的细菌数。

2）43251 和 10403s 细胞株在 A_{600} 处每 0.1OD 代表了大约 2×10^8 个细菌/ml。

3）在李斯特菌感染后 3～5 周研究机体对李斯特菌的特异性免疫反应，可更好地排除非特异性炎症反应的干扰。

二、小鼠感染李斯特菌后的特异性和非特异性免疫反应评估

李斯特菌感染小鼠 5～7d 后机体即产生特异性的免疫应答，最终清除感染小鼠肝脏和脾脏中的细菌。因此，以下用亚致死量李斯特菌感染小鼠，分析感染后 48～72h 的固有免疫反应（参见第一章巨噬细胞的功能检测）以及 7～10d 后的特异性免疫反应能力。本节介绍李斯特菌特异性 T 细胞的制备。

李斯特菌特异性的 CTL 细胞可在体外用李斯特菌感染的巨噬细胞重复刺激产生。CTL 细胞系的维持也依赖于感染李斯特菌的巨噬细胞所提呈抗原表位的诱导。如果抗原表位能够被已知的李斯特菌特异性 T 细胞所识别，那么在体外用肽包被的刺激细胞也能使李斯特菌特异性的 T 细胞增殖（表 31-5）。在体外刺激细胞增殖的最佳肽浓度需要通过每一种肽的滴定实验确定。

表 31-5 李斯特菌诱导的 CTL 抗原表位

抗原表位	抗原	肽序列	MHC	肽体外刺激的最佳浓度
LLO_{91-99}	李斯特菌裂解物	GYKDGNEYI	H2-K^d	10^{-9}mol/L
$p60_{217-225}$	p60	KYGVSVQDI	H2-K^d	10^{-8}mol/L
$p60_{449-457}$	p60	IYVGNGQMI	H2-K^d	10^{-6}mol/L
mpl_{84-92}	李斯特金属蛋白酶	GYLTDNDEI	H2-K^d	10^{-6}mol/L
f-MGWII(A)	LemA	f-MGWII(A)	H2-M3	10^{-6}mol/L
f-MIVTLF	引导肽(转录衰减子)	f-MIVTLF	H2-M3	10^{-6}mol/L

材料与试剂

单核细胞增生性李斯特菌感染的 BALB/c 小鼠；未感染的同系小鼠

J774 巨噬细胞株（ATCC＃TIB 67）

10％胎牛血清的 RPMI-1640 培养液（10-1640 培养液）

5μg/ml 庆大霉素

ACK 溶解液

大鼠刀豆凝聚素 A（ConA）活化上清

1mol/L α-甲基甘露糖苷

1mmol/L 合成肽溶液（表 31-5）

初始脾细胞：按第四章的方法分离的、未感染同系小鼠的脾细胞。经 2000rad 放射线照射灭活

步骤

1）在 10cm 细胞培养皿中用不含抗生素的 10-1640 培养液培养 J774 细胞 1d 后收集细胞，用移液管吸取冷的 PBS 轻轻吹打细胞，台盼蓝拒染法计数细胞。生长良好的细胞长成片，细胞得率约 2×10^7 个/平皿。

2）在 $25cm^2$ 细胞培养瓶中加入 10ml 不含抗生素的 10-1640 培养液和 5×10^6 个 J774 细胞，37℃、5％ CO_2 培养箱培养过夜。同时准备细菌：将单核细胞增生性李斯特菌加入无菌 BHI 肉汤培养基中，37℃摇菌，直到 A_{600} 数值为 0.1（大约 2×10^8 个细菌/ml）。

3）加入 1ml 上述李斯特菌液到细胞培养物中，感染 J774 细胞。37℃培养 30min 后弃去培养上清。加入 10ml 含有 5μg/ml 庆大霉素的 10-1640 培养液，37℃孵育 3h，阻止细菌继续生长。弃去培养上清，再加入 10ml 新鲜的含 5μg/ml 庆大霉素的 10-1640 培养液，孵育过夜。用 2000rad 射线照射细胞培养瓶中的 J774 细胞作为刺激细胞。

4）取李斯特菌感染 7～8d 的 BALB/c 小鼠，分离小鼠脾脏细胞并溶解红细胞（参见第四章）后洗涤、计数，用含有 5μg/ml 庆大霉素的 10-1640 培养液重悬细胞。

5）向射线灭活的感染 J774 细胞的培养瓶中加入 5×10^7～6×10^7 个免疫脾细胞，用 5μg/ml 庆大霉素的 10-1640 培养液调整终体积到 20ml。CO_2 培养箱中继续培养。

6）每 7d 向免疫细胞培养物中加入 1×10^7 个射线灭活感染 J774 细胞和 3×10^7 个初始脾细胞作为刺激细胞和填充细胞。第 3 次刺激后，所有后继刺激物中需加入 10ng/ml IL-2 或大鼠脾细胞 ConA 活化的条件培养上清（含 CTL 克隆生长所需的 IL-2）和 50mmol/L α-甲基甘露糖苷。

注意事项

1）体外重新刺激后的 T 细胞可在刺激后 4～6d 用于 CTL 检测。

2）大鼠脾细胞 ConA 活化上清的最佳浓度需经过实验来确定，但常用的终浓度是 10%（体积比）。其制备方法是：按第四章的方法分离 3 只以上大鼠的脾脏淋巴细胞，合并细胞并用 10-1640 培养液将细胞配成 1×10^7 个/ml。加入终浓度 1μg/ml 的 ConA，CO_2 培养箱中培养细胞 72h。收集上清即为大鼠脾细胞 ConA 活化上清。其中含有 T 细胞生长必须的 IL-2。

3）亦可用合成肽诱导的灭活初始脾细胞代替射线灭活的感染 J774 细胞作为刺激细胞。合成肽诱导的初始脾细胞制备方法：用含 1×10^{-6}～1×10^{-9} mol/L 合成肽（最适诱导浓度需预先确定）的 10-1640 培养液将灭活初始脾细胞稀释到 2×10^7 个/ml，37℃培养 1h，洗去含肽培养液后即可用作刺激细胞。每 5×10^7～6×10^7 个免疫脾细胞中加 1×10^7 个刺激细胞。

（王全兴）

参 考 文 献

Bennouna S, Sukhumavasi W, Denkers EY. 2006. Toxoplasma gondii inhibits toll-like receptor 4 ligand-induced mobilization of intracellular tumor necrosis factor alpha to the surface of mouse peritoneal neutrophils. Infect Immun, 74 (7): 4274～4281.

Costa-Silva TA, Meirac S, Ferreira IM, et al. 2008. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for Toxoplasma gondii. Exp Parasitol, 120 (3): 227～234.

Lipoldová M, Demant P. 2006. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. Nat Rev Genet, 7 (4): 294～305.

Lipoldová M, Svobodová M, Havelková H, et al. 2002. Mouse genetic model for clinical and immunological heterogeneity of leishmaniasis. Immunogenetics, 54 (3): 174～183.

Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H, et al. 2008. Roles of neural stem progenitor cells in cytomegalovirus infection of the brain in mouse models. Pathol Int, 58 (5): 257～267.

Walton SM, Wyrsch P, Munks MW, et al. 2008. The dynamics of mouse cytomegalovirus-specific CD4 T cell responses during acute and latent infection. J Immunol, 181 (2): 1128～1134.

第三十二章　移植排斥实验研究的小动物模型

器官移植是目前治疗终末期器官病变唯一有效的方法，但移植排斥反应是器官移植术后的常见并发症，包括超急性排斥反应、急性排斥反应和慢性排斥反应。虽然近年来随着新型免疫抑制剂 CsA、FK506 等的应用能够有效控制急性排斥反应并减少发生率，但排斥反应特别是慢性排斥仍然是移植器官长期存活的关键问题；此外，长期使用免疫抑制剂增加诱发肿瘤的危险，特别是对肝癌后肝移植的患者，长期使用免疫抑制剂抑制免疫功能的抗排斥作用与促进肿瘤复发之间存在尖锐的矛盾。随着免疫学研究的发展，对移植排斥的免疫学机制的认识越来越深入，特别是新型免疫细胞亚群，如调节性 T 细胞（regulatory T cell，Treg），在控制移植排斥中的作用以及新型免疫抑制剂对不同细胞亚群的作用有了进一步的了解。如何更有效地使用免疫抑制剂、有效地通过机体自身的负向免疫调控作用诱导免疫耐受、延长移植物存活期，成为移植免疫专家特别是临床医生感兴趣的问题。在移植免疫学的研究过程中，根据移植排斥产生的细胞和分子机制，在了解某些免疫抑制分子、细胞以及小分子化合物体外对淋巴细胞特别是 T 细胞的活化、分化以及增殖具有抑制作用后，需通过体内的抗排斥药效学实验进一步了解其在抗移植排斥中可能的作用，移植排斥小动物模型则是研究抗排斥反应的体内效果以及作用的细胞和分子机制的理想模型。特别是由于近交系小鼠、大鼠的品系纯，MHC 的结构明确，分子遗传学和免疫学相关的研究相对深入以及研究手段包括免疫学和分子生物学试剂齐全、方法成熟、成本低的特点，在缺血再灌注损伤、移植排斥机理、免疫耐受诱导和免疫抑制剂研发等现代移植免疫学研究中有其独特的地位。本章节主要介绍移植免疫学研究中常用的小动物模型。

第一节　小鼠异位心脏移植模型

由于近交系小鼠的品系纯，MHC 的结构明确，小鼠分子遗传学和免疫学相关的研究相对深入以及研究手段包括免疫学和分子生物学试剂齐全、方法成熟、成本低的特点，同时由于小鼠异位心脏移植模型操作简便、心脏博跳结果的观察简单、客观，可直接反应心脏移植排斥反应对心脏功能的影响，因此，小鼠异位心脏移植模型是目前移植排斥机理、免疫耐受诱导和免疫抑制剂研发等实验研究中常用的模型。小鼠异位心脏移植模型可分为颈部异位心脏移植和腹部异位心脏移植，本章节介绍本实验室建立的经过改进的 Cuff 技术制备小鼠颈部异位心脏移植模型。该方法具有手术操作简化、手术成功率高等优点。

材料与试剂

动物：SPF 级系统内繁殖饲养的近交系小鼠，8～10 周龄，供体体重 18～22g，受

体体重较供体稍轻，以 16～20g 为宜

手术显微镜：医用双人双目或单人双目手术显微镜，显微手术器械

9-0、11-0 的医用无损伤丝线

长度为 1～2mm，26G（外径为 0.6mm，内径为 0.4mm）Cuff 导管作为颈总动脉 Cuff；长度为 1～2mm，22G（外径为 0.8mm）Cuff 导管作为颈外静脉 Cuff

1%的戊巴比妥钠等

步骤

1）用 1%的戊巴比妥钠以 50mg/kg 体重剂量腹腔注射麻醉小鼠，固定于简易手术台上。

2）皮肤消毒后，肋缘下大横切口开腹，沿双侧腋前线开胸，显露肝上腔静脉，经肝上腔静脉注入 4℃含 100U/ml 肝素的生理盐水 1ml 进行心脏抗凝血及降温。

3）紧贴后胸壁和上胸壁将心脏连同肺脏等组织一并切取，迅速置于 4℃乳酸林格氏液的冰水混合物中，待修整。

4）去除胸腺，食管等多余组织。完全游离主动脉弓，保留 2～3mm 主动脉，切除远端多余动脉组织。在肺动脉主干左右肺动脉分叉处稍前位置分离切断肺动脉（约保留 2mm 长）。

5）9-0 丝线游离、结扎肝上下腔静脉（距入心处 2～3mm），将肺组织连同气管、肺静脉等一同由上述丝线结扎在内，切除所有的肺叶和多余的组织，待移植（图 32-1，见书后彩图）。

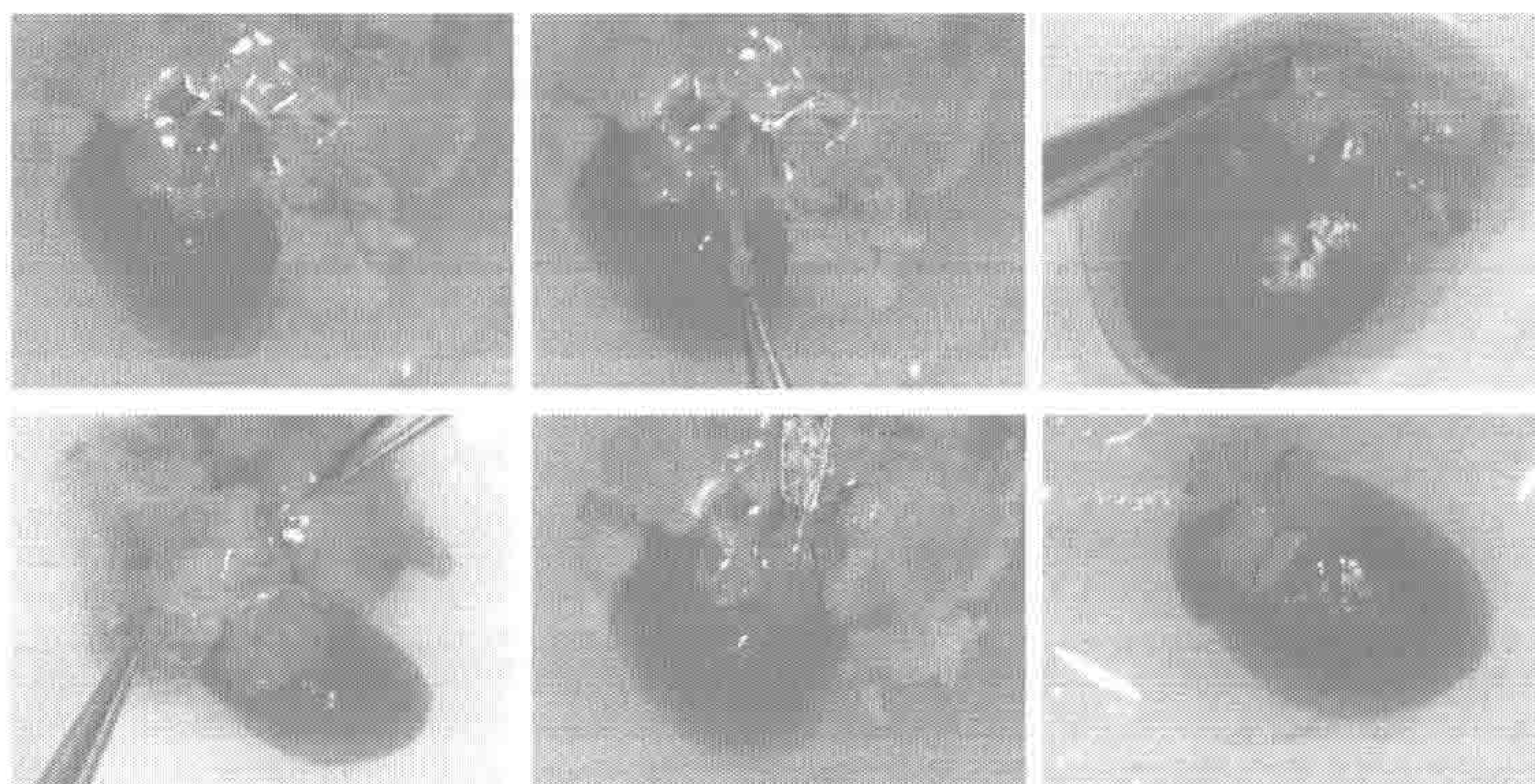


图 32-1　供心的修整

6）受体小鼠麻醉固定同上，采用右侧颈部旁正中纵向切口，上至下颌骨下 3mm，下至锁骨上 3mm，暴露右侧颈部解剖结构。结扎切除下颌处部分腺体，暴露并游离右侧颈外静脉，选取分叉较少节段远心端结扎后，近心端用血管夹封闭血流，近结扎端切断，100U/ml 肝素生理盐水冲洗，安装 0.8mm 内径的 Cuff，用 11-0 的丝线结扎固定。

7）游离颈总动脉，远心端近颈内、外动脉分叉处结扎后，近心端用血管夹阻断血流，于结扎点的近心端切断，100U/ml 肝素生理盐水冲洗，安装 0.4mm 内径

的 Cuff，用 11-0 的丝线固定（图 32-2，见书后彩图）。

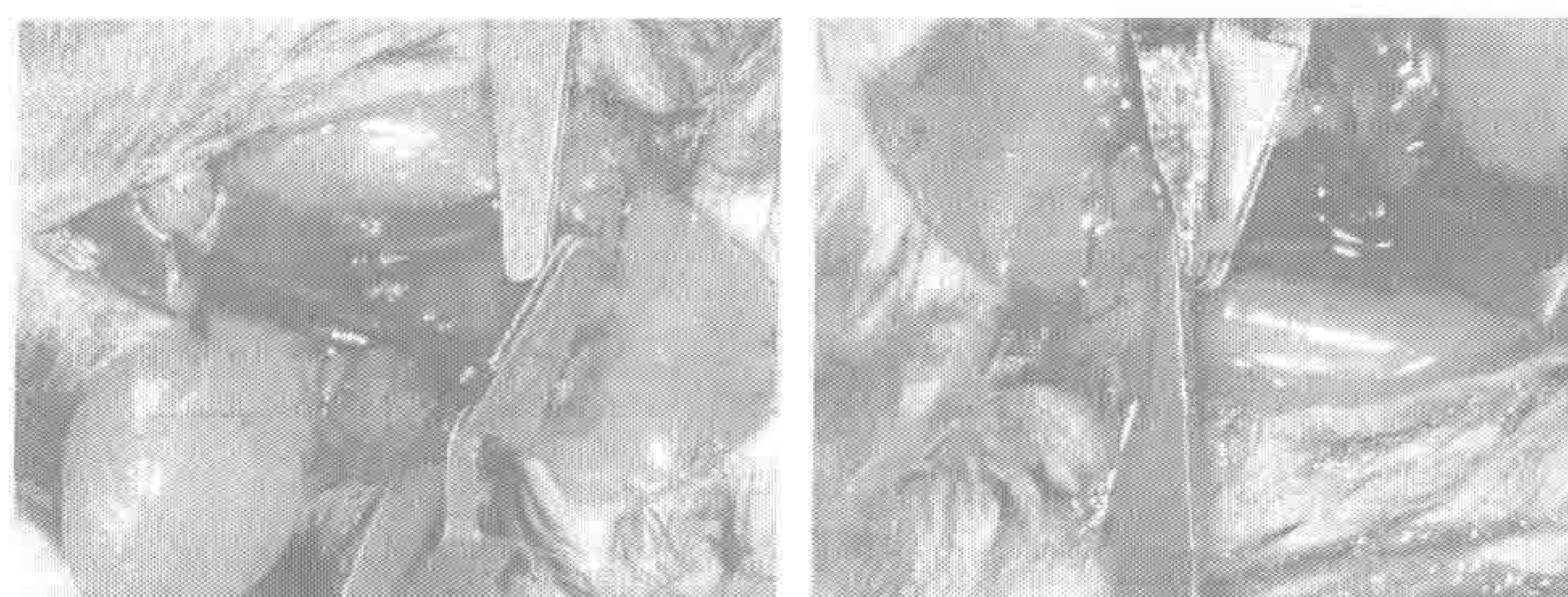


图 32-2　受体颈部血管的修整

8）将供心置于术野，摆放好位置。将受者右侧颈外静脉装好的 Cuff 套入供心的肺动脉干，11-0 的丝线固定；将受体装好 Cuff 的颈总动脉套入供心的主动脉，11-0 的丝线结扎固定。

9）先后开放颈外静脉夹子和颈总动脉夹子，开放血流的同时迅速用 30～40℃温盐水复温，并适当调整供心位置。开放后数秒，心脏开始纤颤，并迅速恢复窦性心率（图 32-3，见书后彩图）。

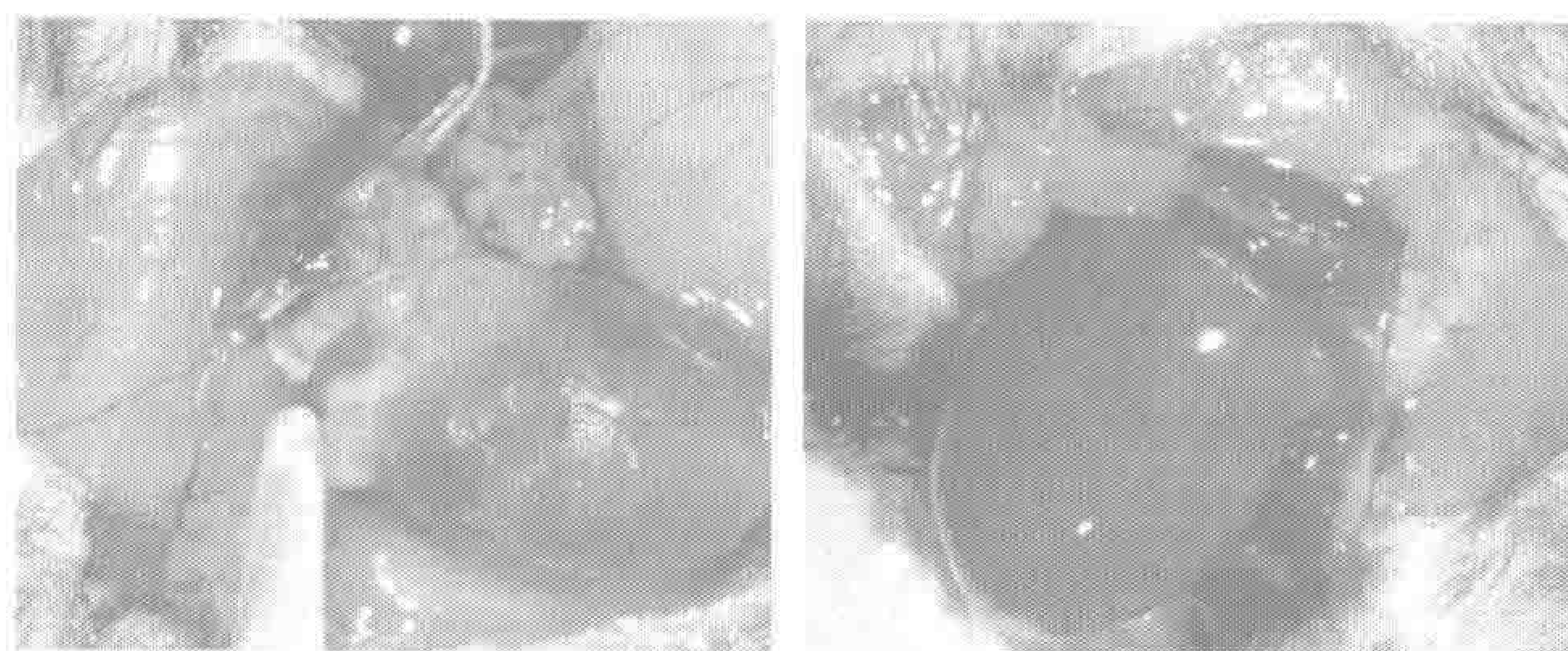


图 32-3　供心移植颈部后血流开放

10）3-0 缝线缝合皮肤皮下组织、关闭切口。

注意事项

1）整个操作过程在清洁级环境中进行。

2）操作需温柔细致，切勿损伤血管和周围组织。

3）供心获取过程操作需精炼、迅速，尽量缩短热缺血时间，使心脏迅速进入冷缺血状态。

4）修心完毕和温和吻合血管过程中，用冰盐水纱布盖于心脏表面，防止心脏暴露于空气中并保持低温。

5）术中、术后小鼠比较虚弱，注意保温。

6）供心循环途径为：受体动脉→供心主动脉→冠状动脉→心肌→冠状静脉→右心房→右心室→肺动脉→受体静脉。左心不参与循环，无射血功能，可视为搏动的异体组织或无负荷异位心，又称为休眠心。

第二节 小鼠胰岛（细胞）移植模型

胰岛细胞移植是目前治疗1型糖尿病最有前景的手段之一，它不仅可以纠正患者体内的代谢紊乱，恢复正常生理调节，而且能防止视网膜、肾小球病变等并发症的发生。另外，其手术方式简单、安全，患者所受痛苦小，易于接受。但免疫排斥反应是胰岛移植成功的主要障碍，所以克服免疫排斥反应和延长移植物的存活时间一直是该领域的重要研究方向。小鼠胰岛细胞移植模型为此类研究提供了很好的模型基础。

材料与试剂

动物：SPF级系统内繁殖饲养的8～10周龄的近交系小鼠，体重在20～25g

V型胶原酶，双硫腙（dithizone，DTZ），Ficoll-400，含钙及不含钙镁的Hank's液，RPMI-1640培养基，胎牛血清，1%戊巴比妥钠

组织消化液：浓度1mg/ml的胶原酶（用含0.14mg/ml $CaCl_2$的Hank's液配制），0.22μm孔径滤膜过滤除菌

胰岛细胞分离液：浓度分别为25%、23%、20%和11%的Ficoll溶液。称取Ficoll粉末100g，加250ml D-Hank's液（不含$CaCl_2$），待全部溶解后再用D-Hank's液定容至400ml，混匀，此为25% Ficoll（ρ=1.084g/ml）。取92ml 25% Ficoll并用D-Hank's液定容至100ml，此为23% Ficoll（ρ=1.077g/ml）；取25% Ficoll 80ml加D-Hank's液定容至100ml，此为20% Ficoll（ρ=1.068g/ml）；取25% Ficoll 44ml加D-Hank's液定容至100ml，此为11% Ficoll（ρ=1.038g/ml）。配制完成后调整pH在7.5，然后高压（11lb[①]左右）灭菌约30min，4℃保存备用

双硫腙（DTZ）染料：称取DTZ粉末10mg溶于3ml无水乙醇，加入50μl浓氨水，再加D-Hank's液12ml，4℃储存备用。临用前用D-Hank's液按1∶100稀释，0.22μm孔径滤膜过滤除菌后使用

步骤

1. 胰岛的分离、纯化及培养

采用非连续密度梯度离心法。

1）取4只小鼠（禁食过夜，不禁水），1%戊巴比妥钠50mg/kg体重经腹腔注射麻醉。

2）用75%乙醇浸泡皮肤消毒。无菌条件下打开腹腔，暴露胆总管及胰、十二指肠等组织。止血钳夹住十二指肠乳头，封闭胆管流出道。经胆总管内插管逆行注入预冷的V型胶原酶溶液2ml，使胰腺充分膨胀。

3）剪开颈动脉处死、放血后，迅速摘取整个胰腺，移入15ml离心管（操作在冰浴中进行）。

① 1lb=0.453 592kg。

4）37℃水浴静置消化25～30min，每隔10min翻转混匀1次，待管中组织呈细砂状，加入4℃ Hank's液10ml终止消化。400目不锈钢丝网过滤，细胞悬液置15ml离心管中，4℃下600r/min离心5min，弃上清。沉淀物再加入4℃ Hank's液洗涤离心2次，上清需尽量吸取干净。

5）上述分离得到的组织物加25% Ficoll溶液4ml，轻柔吹打数次，充分混匀，其上依次小心加入23%、20%和11%的Ficoll溶液各2ml，制成不连续密度梯度离心，在4℃下首先1000r/min离心2min，然后2000r/min离心8min。

6）吸取位于25%～23%、23%～20%和20%～11%界面的白色物质，置于15ml离心管内，加入预冷的RPIM-1640洗涤离心3次（4℃下1000r/min离心5min），弃上清。

7）将纯化的胰岛细胞悬浮于含10%的胎牛血清的RPMI-1640培养基37℃、5% CO_2条件下培养箱中培养，隔日换液。

2. 胰岛细胞活性和纯度鉴定

1）胰岛活性鉴定用台盼蓝染色法，死细胞被染成蓝色，活细胞不着色。具体操作为：加注0.5ml 0.4%的台盼蓝染液至试管中，同时加入0.4ml D-Hank's液和0.1ml细胞悬液，充分混匀，注入血球计数板的计数池中，光镜下分别计数各方格中染成蓝色的细胞团数及未染色细胞团数，重复取样3次，取其平均值，即得出0.1mm^{3}内的平均死细胞及活细胞数。细胞的活率(%)＝活细胞总数（未染色）/全部细胞总数（染色及未染色细胞数之和）×100%。

2）胰岛纯度鉴定采用DTZ染色法：DTZ为螯合指示剂，可与铅、铜、锌等螯合，人和动物（豚鼠除外）的胰岛β细胞因含锌而结合DTZ染料，被染色的细胞团呈现猩红色，其他胰腺细胞均不着色，故DTZ是胰岛细胞的特异性染料。具体操作为：用微量取样器吸取0.1ml细胞悬液，加入D-Hank's液0.4ml，加入DTZ工作液0.5ml，充分混匀静置10min，小心注入血球计数板的计数池中，光镜下计数各方格中相当于直径150μm的阳性细胞团数。按公式换算胰岛细胞数［胰岛当量（islet equivalent，IEQ)］：计算出每一方格的IEQ值，重复取样3次并取其平均值，即得出0.1mm^{3}内的平均IEQ值。胰岛当量（IEQ）＝平均每一方格的IEQ值×10^5×所取样本的原始细胞悬液量（ml）。制备胰岛细胞的纯度估计，即计算DTZ染色阳性细胞占全部细胞（即DTZ染色阳性及阴性的全部细胞的总和）的百分比进行估算。

3. 胰岛细胞移植术

1）分离纯化后的胰岛细胞在镜下观察，取状态良好者，计数300～400个IEQ的胰岛细胞团行肾包膜下移植。

2）受体小鼠术前禁食12h（不禁水），用1%的戊巴比妥钠溶液，按50mg/kg体重剂量经腹腔注射麻醉。固定受体小鼠，左侧腰段备皮并用碘伏消毒，经脊柱旁切口暴露左肾后部。

3）用4号针尖刺入肾包膜下，并稍作分离。取一200μl微量枪头，用明胶海绵封

口，将胰岛细胞吸入一 200μl 微量枪头，再套入一头部已被封口的 200μl 枪头。经 1000r/min 离心 30s，使胰岛下沉至吸头顶端，尽量吸去多余的液体，再用明胶海绵封闭。

4）将枪头经原针孔处插入肾包膜下，用钢丝小心挤压封闭在上端的明胶海绵，使胰岛注入肾包膜下，利用明胶海绵封闭肾包膜切口，若有气泡则予以排除。

5）依次缝合肌肉和皮肤，术后自由进食进水。

第三节　大鼠原位肝移植模型

大鼠原位肝移植是移植免疫学研究重要的动物模型。1973 年，Lee 等首次提出“缝合法”大鼠原位肝移植，此后，二套袖法（门脉、肝下下腔静脉套袖吻合）、三套袖法（门脉、肝上下腔静脉、肝下下腔静脉均用套袖吻合）及各种改良方法相继出现。目前，Kamada 的二套袖法因成功率高已成为主要建模方法，下面介绍本实验室经过改良的二套袖法大鼠原位肝移植模型的建立方法。

材料与试剂

清洁级大鼠，体重 200～250g

显微外科手术器械若干，satinsky 钳一把，自制拉钩 4 个，纱布、棉球若干

5-0 的医用无损伤丝线及 7-0 带针医用无损伤丝线

下腔静脉和门静脉套管均选用硬质薄壁的聚乙烯管，下腔静脉套管外径 2.8mm，内径 2.5mm，长 1.5mm；门静脉套管外径 2.2mm，内径 2.0mm，长 1.5mm。均留有尾翼，外管壁刻槽

胆管支架采用硬膜外导管，长 3～4mm，两端削成斜面

1%戊巴比妥钠，阿托品，乙醚

步骤

1. 供体手术

1）选择健康大鼠，50mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，仰卧位橡皮筋固定四肢，安尔碘消毒。取腹部大十字切口开腹，暴露肝脏等器官及组织。

2）切断镰状韧带、左三角韧带，5-0 丝线结扎左膈下静脉。游离胃前后肝叶，切断肝胃韧带，双结扎离断肝、食管之间的血管。

3）钝性分离肝动脉，带线，待结扎。分离胆总管，距肝总管分叉下方 5mm 处剪开一小口，插入胆管支架，5-0 线结扎打结，于打结线远端离断胆总管。

4）钝性分离门静脉，紧贴门静脉处用 7-0 丝线双结扎，离断幽门静脉。

5）钝性分离肝下下腔静脉至左肾静脉上端。紧贴下腔静脉用 7-0 丝线双结扎离断右肾静脉，靠近下腔静脉处双结扎离断右肾上腺血管丛。

6）分离切断右三角韧带及肝后韧带。经腰静脉缓慢均匀推注肝素盐水 1ml（100U/ml），全身肝素化。腹主动脉髂动脉分叉处插入套管针待灌注，剪开膈肌，血管钳阻断胸主动脉，剪断肝上下腔静脉及下腔静脉，缓慢均匀滴注 4℃

的林格氏液 20ml，4℃林格氏液肝脏外降温。

7）自左肾静脉分叉处离断肝下下腔静脉。完整保留肝上下腔静脉，保留部分膈肌组织，结扎肝动脉远端离断，自脾静脉分叉处离断门静脉。取下肝脏，置于4℃的林格氏液中，其下覆冰块保持低温。

8）供肝面朝上，将血管袖套套在肝下下腔静脉外，袖套柄部指向肝叶嵴部，无损伤血管钳夹住袖套柄，并用橡皮泥固定血管钳，外翻腔静脉，肾静脉结扎点暴露在袖套外 9 点钟位置，5-0 线结扎固定。

9）相同方法实行门静脉套管，袖套柄部指向胆管，幽门静脉结扎点暴露在袖套外 3 点钟方向。修剪多余膈肌组织，只保留肝上下腔静脉，于 3 点、9 点方向各缝一针打结，备用。

2. 受体手术

1）受体术前禁食 12h，不禁水；术前 30min 肌注阿托品 0.03mg。将受体大鼠置于密封乙醚罐中诱导麻醉，经鼻面罩吸入乙醚维持麻醉，密切观察大鼠呼吸深度及频率判断麻醉深浅，及时调整。

2）仰卧位橡皮筋固定四肢，腹部备皮，安尔碘消毒，腹部正中切口开腹，丝线捆扎剑突向头侧牵引固定，自制回形针拉钩将季肋部向两侧牵拉，暴露肝脏，腰部垫高。

3）切断镰状韧带、左三角韧带，5-0 丝线结扎左膈下静脉。游离胃前后肝叶，切断肝胃韧带，双结扎离断肝后食管间的血管。

4）钝性分离结扎肝动脉，近端离断。于肝总管分叉上方分离两支胆管，各结扎切断，留线以做牵引，向下分离胆管 5mm。

5）钝性分离肝下下腔静脉至右肾静脉上端，结扎右肾上腺血管丛。切断右三角韧带及肝后韧带，并在腹后壁与肝上下腔静脉间置入一粗线以便牵引。

6）门脉夹夹闭门静脉，经门脉注入生理盐水 1ml 驱肝，血管夹夹闭肝下腔静脉，牵引腹后壁与下腔静脉间留置的粗线，satinsky 钳经左侧膈下置入，连同部分膈肌夹闭肝上下腔静脉。贴近肝脏剪断肝上下腔静脉，剪断门静脉，剪断肝下下腔静脉，取出肝脏。结扎肝短静脉，清理腹腔及止血。

7）将供肝原位置入，摆好位置，冰盐水纱布覆盖。供体肝上腔静脉左右两角牵引线与受体相应位置缝合并结扎，从左侧开始 7-0 线依次连续外翻缝合后壁、前壁，至左侧脚与原线结打结。打结前向腔静脉注入生理盐水，并轻压肝脏以排尽空气（图 32-4A，见书后彩图）。

8）将肝叶翻向头侧，无创血管钳水平夹闭受体门静脉残端，门静脉夹向下平移 5mm，紧贴血管钳将受体门脉剪一切口，用生理盐水排尽受体门脉内血栓及供体门脉套管内空气，将套管插入门静脉内，并结扎固定。松开门静脉夹，开放 satinsky 钳，恢复部分肝脏血流。

9）血管夹夹闭供体肝下下腔静脉，轻放受体端下腔静脉血管夹排放血栓，生理盐水冲洗、排气，将套管插入受体下腔静脉内，结扎固定，开放血管夹。

10）牵引受体两支胆管线结，于分叉处剪一小口，插入胆管支架，结扎固定，并与

供体胆管的尾线打结，避免支架脱出（图 32-4B，见书后彩图）。

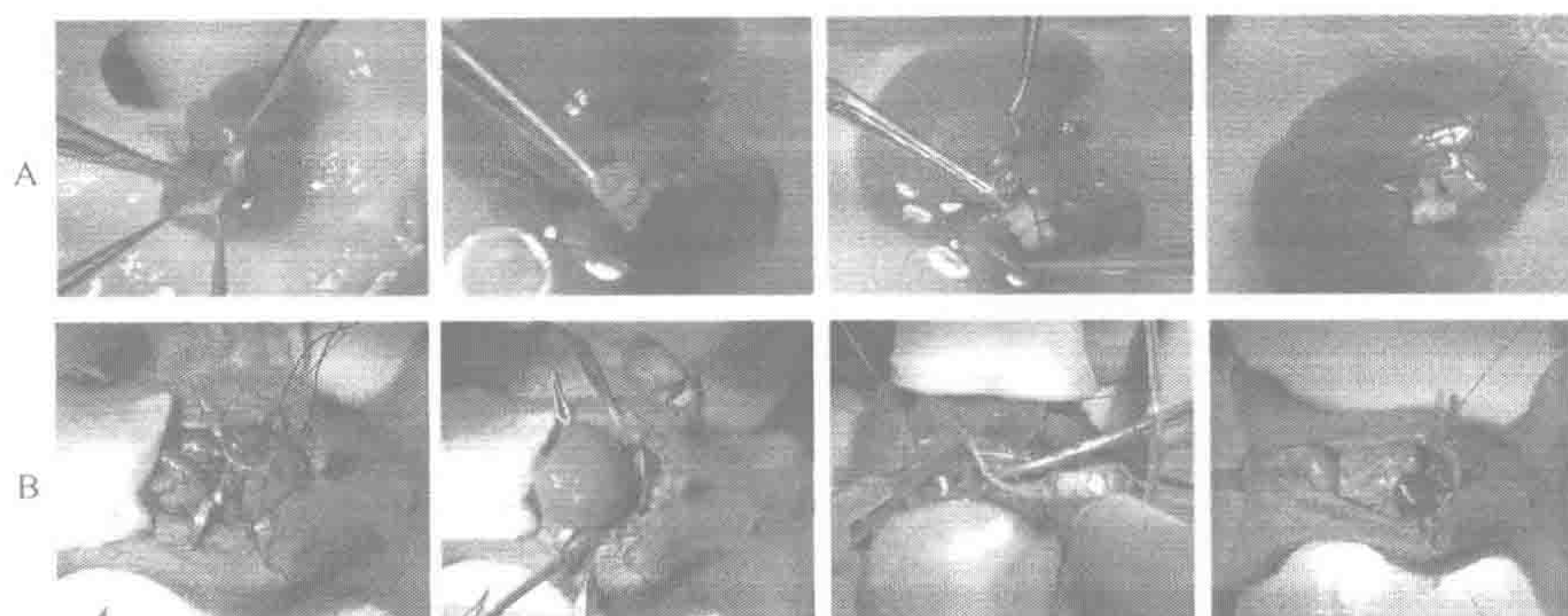


图 32-4　大鼠肝移植模型

A. 供肝的修整；B. 供肝的移植

11）将各肝叶及肠管摆回其正常的生理位置，用大网膜覆盖肝门。缝合皮下组织及皮肤关腹。术后分笼单独喂养，白炽灯照射复温。12h 后进食水。

注意事项

1）应注意无菌操作，预防受者动物感染。

2）操作轻柔，防止刺伤、压伤供肝。

3）供肝注意降温，休整时应放置冰基座上降温，尽量减少冷缺血时间，控制在 6h 以内，使用肾宝、uw 液（University of Wisconsin solution）可延长保存时间。

4）受体手术乙醚麻醉时，注意观察大鼠呼吸心跳，防止麻醉过深导致大鼠死亡。

5）上肝时动作迅速，尽可能缩短无肝期。

6）管道吻合、套接时注意去除气泡和血栓，防止形成血栓、气栓。

7）术后动物要与其他动物分开，以防相互撕咬、挤压。

（王全兴）

参考文献

Kamada N, Calne RY. 1979. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. Transplantation, 28 (1): 47～50.

Wang QX, Liu Y, Li XK. 2005. A simplified technique for heterotopic vascularized cervical heart transplantation in mice. Microsurgery, 25 (1): 76～79.

Wang QX, Uno T, Miyamoto Y, et al. 2004. The Enhanced Effects of Biodegradable Microsphere Loaded Tacrolimus on Mice Islet Allograft and Its Reduced Adverse Effects On Insulin Secretion. Am J Transplant, 4: 1～7.

第三十三章　肿瘤动物模型

肿瘤（tumor 或 neoplasm）是在各种致瘤因素作用下，细胞在失去正常生长调控后，异常增生形成的新生物。肿瘤为人类常见病，恶性肿瘤因其致死率高而成为危害人类健康最严重的疾病之一。虽然近年来对于肿瘤发生机制及其防治的研究取得了很大进展，但是没有解决的问题仍然众多，为了更深入地研究肿瘤的病因学、发病学及其防治，肿瘤动物模型便成为一个有力的工具。

按照肿瘤产生机理，肿瘤动物模型可以划分为自发性、诱发性、移植性肿瘤动物模型以及转基因肿瘤动物模型。在免疫学领域，移植性肿瘤动物模型应用最为广泛，特别是人体肿瘤异种移植性模型为肿瘤免疫学研究做出了较大贡献。

本章主要就自发性、诱发性、移植性、转移性肿瘤动物模型的建立方法及注意事项，以及肿瘤模型的评价指标、肿瘤内及其周围组织单个核细胞的分离方法做一介绍。

第一节　自发性肿瘤动物模型

自发性肿瘤动物模型是指实验动物未经任何有意识的人为处置，在自然情况下发生的肿瘤。其发生的类型和发病率随实验动物的品系、种属的不同而存在差异，目前人们已经培育出自发性肿瘤近交系小鼠品系 200 多个。

动物自发性肿瘤由于无人为干预因素，肿瘤的发生发展较自然，可以用于观察分析致癌因素、遗传因素在肿瘤发生发展中的作用。自发性肿瘤由于其发生、生物学特点及组织形态特点与人类的肿瘤近似，比其他肿瘤模型更接近于人类肿瘤的真实情况。另外，自发性肿瘤是移植性肿瘤细胞的来源，如 Lewis 肺癌、Ehrilich 腹水瘤等。所以自发性肿瘤模型用于进行肿瘤发病学及病因学研究较为理想。

但是这种模型有其局限性，包括肿瘤的发生率不稳定，肿瘤的生长情况可能参差不齐，肿瘤生长速度慢，实验费时，成本高，要得到大量病程类似的病例资料难于在短时间内完成。所以自发性肿瘤模型较少用于药效学等的研究。

一、小鼠自发性乳腺癌模型

有些品系的小鼠乳腺癌高发，利用这些小鼠作自发性乳腺癌模型，肿瘤生长于体表容易发现，能够准确观察其发生和发展速度。乳腺肿瘤是小鼠最为常见的自发性肿瘤，可以发生肺转移。

材料与试剂

C3H 生育雌鼠：乳腺癌发生率 85%～100%

A 系生育雌鼠：乳腺癌发生率 80%～84%

CBA 系雌鼠：乳腺癌发生率 60%～65%

DBA 系小鼠：DBA/1 生育雌鼠乳腺癌发生率 61.5%～75%；DBA/2 发病率为 50%～60%

DD 系生育雌鼠：乳腺癌发生率 60%～84%

PBA 35 周龄生育雌鼠：乳腺癌发生率 75%

R Ⅲ系生育雌鼠：乳腺癌发生率 88%

相比之下，普通的小鼠乳腺癌发生率低。例如，BALB/c 生育雌鼠，乳腺癌发生率 3%；C57BL/6J 生育雌鼠，乳腺癌发生率 1%

步骤

各种小鼠的发病时间不一致，但多数发生于出生 1 年后。待肿瘤发生后，每天观察肿瘤大小、位置及小鼠的生存期等情况，可以给予调节免疫的药物，观察对肿瘤影响，以及观察肿瘤发生发展过程中肿瘤组织及其周围组织免疫基因的表达及免疫细胞的变化情况。

注意事项

1）应了解所选小鼠的背景，及自发性乳腺癌的时间差异，通常同一品系的小鼠的发病年龄、肿瘤数目、发生肿瘤后的存活期比较类似，而不同品系则差异较大。

2）小鼠自发性乳腺癌与病毒感染、激素、遗传、饲料及免疫状况有关，所以要控制饲养条件，如要用恒定的同一品牌全价营养饲料、保证环境清洁、及时清除病弱小鼠等。

3）小鼠自发性乳腺癌的发生数目、大小、部位等都可能不同，所以应及时配对分组以满足实验需要。

二、小鼠自发性白血病模型

小鼠自发性白血病以淋巴细胞性白血病为主。

材料

AKR 小鼠：8～9 月龄，白血病发病率 80%～90%，雌性高于雄性

Afb 小鼠：8～9 月龄，白血病发病率雌性 90%，雄性 65%

C58 系小鼠：12 月龄内，白血病发病率 95%～97%，雌性高于雄性

步骤

筛查小鼠，白血病小鼠脾和淋巴结肿大，血象异常，经血液学检查确诊。观察其存活时间。在确诊后可以给予免疫调节药物观察疗效，或用于观察发病与发展期内，免疫相关基因与免疫细胞的变化情况。

注意事项

1）要根据小鼠诊断时间及病情合理配对分组。

2）注意同一个品系的小鼠，性别不同对发病率的影响。

三、其他小鼠自发性肿瘤模型

除最常见的自发性乳腺癌与白血病模型外，其他还有小鼠自发性肺癌模型（A 系小鼠

18 月龄达 90%），小鼠自发性肝脏肿瘤模型（大于 14 月龄的 C3Hf 系雄鼠、C3H 系雄鼠、C3H/He 雄鼠发病率分别 72%、85%、80%），小鼠自发性淋巴肉瘤（35 周龄 PBA 系小鼠发病率 100%），小鼠自发性卵巢瘤（BALB/c 生产雌鼠发病率 75.8%、17 月龄 RⅢ系生产雌鼠发病率 60%），小鼠自发性胃肠道肿瘤（I 系小鼠自发率可达 100%）等。

第二节　诱发性肿瘤模型

诱发性肿瘤模型是指用外源性致癌物，如化学性、物理性（如放射）、生物性（如病毒）在实验条件下诱发的动物肿瘤模型。常用于肿瘤病因学、肿瘤遗传学、肿瘤生物学，以及肿瘤防治的研究。外源性致癌物以化学性致癌物最为常用，下面将重点介绍。

诱发性肿瘤模型其发病率远高于自发性肿瘤模型，恶性度高，用于建立肿瘤细胞系或者移植性肿瘤模型更为容易，且诱导方法操作简便，重复性好，诱导时间相对于自发性肿瘤短，能够相对短时间大量复制模型，其发病过程也可以基本模拟人类肿瘤。

但是，并非所有的肿瘤都能够人工诱导，相对于移植性肿瘤诱发时间较长，难以达到 100%成功率，模型的病程与肿瘤的进展不一，肿瘤恶性程度有限，浸润和转移能力较低，其诱发条件单一，发病机制并不完全与人类相同，而且对动物实验室的防护要求高。

一、化学致癌物的选择

人类肿瘤大多数由外界环境因素起作用，其中化学性致癌物为其中的主要因素，但是各种化学致癌物的特点不一，常应用的致癌剂有如下几种。

1）亚硝胺类：致癌性强，小剂量一次性给药即可致癌；可导致多种癌症；亚硝胺结构不同器官亲和性不同，如甲基苄基亚硝胺等不对称亚硝胺嗜食管，二甲基亚硝胺等对称亚硝胺嗜肝脏。

2）黄曲霉毒素：致癌性极强，毒性极大，易致死，为已知的最强致癌物，能够诱发肝、肾、胃肠腺癌。

3）芳香胺及偶氮染料类：诱导期长，给药剂量大，癌肿发生部位距给药部位远，有种属易感性差异。例如，乌拉坦诱发小鼠肺癌、联苯胺诱发犬膀胱癌、小鼠肝癌、大鼠肠癌及外耳道癌，四氯化碳及氯仿可诱导大鼠、小鼠肝癌。

二、化学致癌物的给药途径

实验时，应根据动物种属、致癌物的性质、研究的目的来选择不同的给药途径。

1）经口给药：饮水、饲料中添加药物或灌服给药，主要用于诱导消化道肿瘤。

2）经气管给药：将致癌物悬液直接注入气管内，诱发肺癌。

3）注射给药：如皮下、肌内、静脉、胸腔、腹腔内等。

4）穿线给药：用吸收了致癌物的棉线穿入所选靶器官，直接接触特定部位，如食管、胃、子宫等。

5）包埋给药：将致癌物埋入皮下或组织内，或将致癌物作用过的组织器官或细胞移植入同品系动物皮下。

6）涂抹给药：将致癌物直接涂抹于裸露的耳部及背部皮肤等。

三、常见肿瘤的诱发模型

致癌物种类繁多，所诱发的肿瘤种类也很多，根据所用的药物不同，目的不同，可采用不同途径和方法进行诱导，而有些方法显得相当复杂，诱导的周期和结果各异，以下只简要介绍几种常见肿瘤诱导的基本方法（表 33-1）。

表 33-1　几种常见肿瘤诱导的基本方法

	动物	药物	给药剂量、途径及方法	诱发周期及结果	说明
诱发性食管癌	大鼠	甲基苄基亚硝胺(MBNA)	MBNA 0.005%～0.2%水溶液灌喂，每日 1mg/kg 体重	第 27 天出现食管乳头状瘤，第 7 个月 53%诱发食管癌	如果用小鼠，每日 0.25mg/kg 体重7～8 个月后 85%～100% 诱发前胃癌
	大鼠	二烃黄樟素(dihydrosaforle)	饲料中加入药物浓度为 25×10^{-4}～100×10^{-4}	7 个月 20%～75%诱发食管癌	
诱发性肺癌	小鼠	二乙基亚硝胺(DENA)	每周皮下注射 1%的 DENA 生理盐水 1 次，56mg/kg 体重，至总剂量 868mg	实验 161d，肺癌发生率 81%，其中支气管鳞状细胞癌占 41%	若 DENA 总剂量达到 1176mg，半年诱发率可大于 90%
	A 系小鼠或 C57BL/6 小鼠	乌拉坦(脲酯)	每隔 3～5d 腹腔注射 10%乌拉坦生理盐水 0.1～0.3ml，共 2～3 个月	3～4 个月后肺癌发生率 90%～100%	多为良性腺瘤和纤维瘤
	猴	3,4-苯并芘与氧化铁混合液	气管内灌注，每周 1 次，共 10 次	诱发鳞状细胞癌	给大鼠气管内吸入硫酸铵气溶剂可诱发肺腺癌
诱发性肝癌	大鼠	二乙基硝胺(DENA)	0.25%的 DENA 水溶液灌胃（10mg/kg 体重）或 0.025%水溶液水饮，半年停药	7～9 个月时肝癌发生率 70%～100%	诱癌早期作肝叶部分切除可以减少药物用量，缩短诱导时间
		4-二甲基氨基偶氮苯(DAB)	维生素 B_2(每日少于1.5～2mg/kg)，含 0.06% DAB 的饲料喂养，4～4.5 个月停止给药	4～6 个月时 60%发生肝癌	
		2-乙酰氨基芴(2-AAF)	每日给予大鼠 2～3mg 2-AAF 混于饲料中（浓度 0.03%），持续 3～4 个月	6 个月后 80%～90%发生肝癌	多数属于高分化型肝癌
		黄曲霉毒素 B_1(aflatoxin B_1)	用 DMSO 溶解黄曲霉毒素 B_1，每日 400μg/kg 体重腹腔注射，2 周 12 次，改喂含 0.015% 2-AAF 饲料 1 周，麻醉，切除肝中叶及左外侧叶，再继续喂含 0.015% 2-AAF 饲料 1 周，换正常饲料，3d 后完成诱癌过程	此法可短期内完成诱癌程序，达 80%以上	可在饲料中加入黄曲霉毒素 B_1 (0.011×10^{-6}～0.015×10^{-6} 含量)6 个月可诱导肝癌达 80%以上
	小鼠	亚氨基偶氮甲苯(OAAT)	将含 1% OAAT 的溶液2～3 滴涂于小鼠肩胛，隔日一次，共 100 次	7 个月后 55%出现肝癌	也可用 2.5mg OAAT 溶于葵花子油中皮下注射 C3H 小鼠，10d 一次

续表

	动物	药物	给药剂量、途径及方法	诱发周期及结果	说明
诱发性胃癌	近交系 Wistar 大鼠	甲基硝基亚硝基胍(MNNG)	饮水中加入 0.01%的 MNNG(100μg/ml)，隔日一次	80%可诱发胃癌	主要为高分化腺癌
		甲基胆蒽(MC)	无菌手术，在胃黏膜面穿挂含 MC 的线结，术后禁食半天	半个月后可形成早期浸润癌，3～4 个月，诱癌率达 64.6%	其中有腺癌、腺肉瘤、早期浸润癌及黏膜内腺癌
诱发性结肠癌	4 周雄 Wistar 大鼠	二甲基苯肼(DMH)	将 4mg/ml 的 DMH 溶液 100ml，加入 27mg EDTA，以 NaOH 调节 pH 至 6.5 后，皮下注射 21mg/kg 体重，每周一次共 21 周	24 周时，结肠癌发生率为 81%～100%	绝大多数为腺癌
	6 周 Wistar 大鼠	甲基硝基亚硝基胍(MNNG)	33%乙醇配制 0.67%的 MNNG 乙醇溶液，用导尿管插入直肠 7～8cm 每次注入上述溶液 0.3ml，每周 2 次，共 25 次	12～13 个月时，诱癌成功率 80%以上	主要发生于肠壁黏膜面，多数为腺癌及其与黏液腺癌混合的混合癌，可出现部分纤维肉瘤

四、诱发性肿瘤模型的注意事项

1）并不是每种动物都能诱导任何肿瘤，要选择敏感动物，大鼠在诱发性肿瘤模型中最常用，比小鼠等其他动物更敏感，小鼠也经常用到，要根据诱导肿瘤的类型和部位等决定选择何种动物及其种系。

2）选择合适的致癌物剂量，以保证动物存活，诱发率高而诱发期短为佳，采用复合诱癌方法效果较为理想，如将致癌剂与促癌剂联合应用，可以减少药物用量，而增强诱癌效果。

3）诱发的部位尽量模拟人类，使其生物学特征与人类类似。

4）要调节动物的饮食，使癌症易于发生，如高脂对诱发肝癌及皮肤癌有利。但是又要注意动物的营养，防止动物意外死亡或者诱发出来的肿瘤生长不良。

5）要特别注意实验者的安全防护，防止沾染有害的诱癌剂等，尽量使用对环境污染小而且易于控制的方法，并将实验废物与动物尸体作无害化处理。

第三节　移植性肿瘤模型

移植性肿瘤因其明确、稳定的生物学特性、成瘤率、成瘤周期大大缩短、良好的可重复性等特点，成为最为广泛应用的肿瘤模型，是研究肿瘤免疫学的必不可少的工具。

一、移植性肿瘤模型的分类

移植性肿瘤模型可分为同种移植和异种移植两类。前者受者动物正常，而肿瘤的成瘤率高，生长快，成本低；后者则将人或动物的肿瘤移植到另一种属动物体内，受者动物有免疫缺陷，成本高，但是为直接研究人类肿瘤提供了一条非常重要的途径。

二、受者动物的选择

以大鼠、小鼠和地鼠最为常用。如果要研究某一现象在肿瘤中的广泛性，应用3种及以上的肿瘤来验证。要根据肿瘤细胞选择合适的近交系、远交系或杂交F_1代的动物。除乳腺癌等有性别区分的肿瘤外，雌性和雄性鼠都可应用，但是在进行免疫学实验时，如果肿瘤细胞来源动物的性别未知，为了排除对如Y染色体抗原的免疫的影响，应尽量选择雄性动物作为接种对象。肿瘤接种一般用成年动物，小鼠18～22g，大鼠50～70g，每组至少10只，裸鼠可以用5～10只。

三、肿瘤细胞的选择

肿瘤细胞株是指通过选择法或克隆法从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊遗传、生化等特定标记的细胞群。其组织学类型及生长特性趋于稳定，并能够在同系、同种或异种动物体内传代。目前已经有几百种动物、人的瘤株可供应用。但是人癌手术标本移植成功率低，经动物反复传代后能够明显提高移植成功率。不同肿瘤的移植成功率与生长速度各不相同，实验时需要参考文献报道或经预实验确定。需要注意的是，在肿瘤免疫研究中，经常用最小100%致瘤量肿瘤细胞数建造模型，以便得到实验组间更加清晰的差异性。

四、肿瘤移植部位与途径的选择

根据肿瘤移植的部位，可分为异位移植和原位移植。异位移植以皮下移植最为常用，以颈背部近腋部皮肤宽松的位置最佳（较其他部位接种肿瘤能够长得更大，不易破溃，小鼠存活期更长），操作简便，肿瘤表浅易于观察，潜伏期短，个体差异小；缺点是由于供血较差，待肿瘤长到一定大小后，瘤体内部易坏死，皮肤易破溃，而且由于异位生长，性状有不同程度的改变，如转移率降低。其他的异位移植如肾包膜下、脑内、肌肉、腹腔等也有应用。

原位移植指将肿瘤组织或细胞移植到肿瘤原发部位对应的器官组织内，可以获得与原发肿瘤相近的微环境，而且局部血供丰富，肿瘤生长快且易于转移，接种细胞少，成瘤率高。对于研究肿瘤部位及肿瘤周围免疫分子及细胞的变化尤其具有重要意义。缺点是操作要求高，不能直观观察，个体差异较大，缺少肿瘤发生过程。

五、移植性肿瘤模型的注意事项

1）应注意无菌操作，预防受者动物感染，否则动物感染会对动物的免疫状态造成很大的冲击，影响到肿瘤的生长。

2）手术切除或者皮下接种获得的肿瘤组织，体外要及时处理，防止细胞死亡，最好在2h内完成。

3）肿瘤细胞株移植要用处于对数生长期的细胞，每只小鼠接种液体量一般为0.1～0.2ml。

4）使用肿瘤组织块接种要注意剔除包膜和坏死的组织，选择生长良好的新鲜组织。

5）实验中要根据手术时间选择适当的麻醉剂（如乙醚吸入等）以便于实验操作，但必须防止麻醉过度，以防止动物意外死亡或者因麻醉药中毒而降低动物的免疫力。

6）术后动物要与其他动物分开，以防相互撕咬、挤压。

7）伦理学问题，一般在荷瘤小鼠肿瘤直径超过 3cm、肿瘤破溃或者小鼠濒死时要给予小鼠安乐死，一般用 CO_2 麻痹或者过量的麻醉药实施。

第四节　人体肿瘤移植入缺陷动物

由于免疫排斥的存在，将人体肿瘤移植入动物体内需要选择合适的宿主，如 T 细胞缺陷的裸小鼠，T、B 细胞联合缺陷的 SCID 小鼠，T、B、NK 联合缺陷的 BNX 小鼠和 NOD-SCID 小鼠，使用免疫抑制剂或放射线照射过的小鼠等。这种模型因为直接应用了人的肿瘤细胞，其病理组织形态与遗传特征与人相同，所以常应用于直接研究人类肿瘤的生物学特征及肿瘤的治疗。下面以裸小鼠接种人肝癌 SSMC-7721 肿瘤组织块举例说明。

材料与试剂

动物：SPF 级系统内繁殖饲养的 BALB/c 裸小鼠，6～8 周龄

肿瘤细胞：将人肝癌 SSMC-7721 肿瘤组织块剪碎（2～$3mm^3$），备用

20 号套管针

麻醉剂如乙醚等

步骤

1）超净台内以乙醚吸入法麻醉小鼠。

2）用套管针吸取，或者直接用无菌眼科镊夹取 SSMC-7721 肿瘤组织块，接种于 BALB/c 裸小鼠的左侧腋窝皮下（以接种 1 块/鼠为佳，也可以 2～3 块鼠，尽量使每只小鼠接种量相等）。

3）接种 24h 后，随机分组，给予药物或者免疫治疗等，实验 4～5 周。

4）停药 24h 后，观察小鼠一般情况，称体重，剥离肿瘤称重，计算抑瘤率等指标。

注意事项

1）裸鼠为免疫缺陷动物，所以所有操作需要在无菌条件下完成，小鼠饲养于 SPF 级环境中。

2）在此实验中，肿瘤组织块或细胞可以原位移植于肝脏，以观察肝脏局部的免疫细胞变化情况。

3）动物在 4～5 周肿瘤应该在 1g 以上，如果 20%以上肿瘤不到 0.4g，表明肿瘤生长不良，需要分析原因，重新实验。

4）给予药物或免疫治疗期间，如小鼠超过 20%死亡或体重下降 15%以上，表明处理因素有毒性。

5）由于 BALB/c 裸小鼠 T 细胞缺陷，B 细胞功能也受到影响，对于研究 NK 细胞、巨噬细胞、粒细胞等对肿瘤生长的作用机制研究有一定意义。

第五节　肿瘤转移模型

肿瘤转移是恶性肿瘤的重要特点之一，肿瘤在局部生长、浸润，肿瘤细胞侵入血管和淋巴系统，然后黏附并在局部增殖，继而形成转移。在局部，肿瘤细胞和微环境相互作用，逃避了机体的免疫监视，适应新的环境后方能获得转移成功。肿瘤转移模型是研究肿瘤转移机制及抗肿瘤的最得力工具之一。

肿瘤转移模型可以根据不同的标准分类：①按照转移过程，可以分为自发性肿瘤转移模型和实验性肿瘤转移模型；②根据途径，可分为血道转移和淋巴道转移模型；③根据部位，可分为原位移植肿瘤转移模型和异位移植肿瘤转移模型等。

计算 A 器官肿瘤转移抑制率公式为：A 器官转移抑制率（%）＝（1－A 器官治疗组平均转移瘤数/A 器官对照组平均转移瘤数）×100%。现将肿瘤转移模型的应用举例如下。

一、B16-BL6 小鼠黑色素瘤自发性肺转移模型

B16 细胞株来源于 C57BL/6 背景的小鼠，B16-BL6 细胞来自于 B16 细胞，但是其转移能力较 B16 细胞有了巨大的提高，瘤细胞生长迅速，侵袭血管进入循环，主要转移到肺。此模型为观察肿瘤细胞侵袭-血道转移-侵袭之肿瘤转移过程的典型模型。

材料与试剂

C57BL/6 小鼠

处于对数生长期的 B16-BL6 细胞株

1ml 注射器

乙醚

Bouin 固定液

步骤

1）取处于对数生长期的 B16-BL6 细胞，用含 EDTA 的胰酶消化后，收集，重悬于 PBS 中，调整细胞浓度 1×10^7 个/ml。

2）每只 C57BL/6 小鼠后肢足垫皮下注射 50μl 瘤细胞悬液。

3）分组，每组 10 只，对小鼠进行药物或免疫治疗等处理。

4）给药 3 周后，乙醚麻醉下，结扎股动脉后切除注射肿瘤的后肢，去掉原发灶，停药 1d。

5）再次连续给药 3 周后，给予小鼠安乐死，取出肺，Bouin 固定液固定后于解剖显微镜下计数肺组织表面肿瘤结节。

注意事项

1）要用处于对数生长期的 B16-BL6 细胞，小鼠要给予良好的营养（喂饲鸡蛋、瓜子等），若未治疗组大于 20%的小鼠出现肿瘤滞涨，应考虑到肿瘤生长不良，重新进行实验。

2）应避免使动物麻醉过深或出血过多，否则将造成小鼠死亡或者体质严重下降，影响实验。

3）同组小鼠之间，肺脏表面结节数可能有较大差异，所以必须保证每组动物的数量（不少于 10 只），以便于进行统计。

4）因为 B16 细胞为黑色素细胞，如果应用其他无色素肿瘤进行类似实验，可能需要对肺脏进行染色或者制备切片并染色后进行观察。

二、B16-F10 实验性肺转移模型

B16-F10 是从 B16 细胞衍生而来的肺高转移瘤细胞株。将 B16-F10 细胞直接注射到小鼠静脉，主要形成肺部转移，肺外极少。该模型可以反映人类肿瘤细胞进入血液后直至形成转移的步骤，而忽略了肿瘤在局部侵袭入血管的过程，有别于自发性转移模型，称之为实验性转移模型。对于研究肿瘤细胞在循环系统中的生存，肿瘤细胞黏附，肿瘤细胞在靶器官中的增殖过程，以及免疫系统在以上过程中的作用，实验性转移模型具有特别的优势。

材料与试剂

C57BL/6 小鼠，6～8 周龄

处于对数生长期的 B16-F10 株

1ml 注射器

小鼠尾静脉注射固定装置

Bouin 固定液

步骤

1）以含有 EDTA 的胰酶消化 B16-F10 细胞，PBS 洗涤 2 次后，重悬至 1×10^6 个细胞/ml。

2）用小鼠尾静脉注射固定装置固定小鼠，用 1ml 注射器尾静脉注射 0.2ml 上述瘤细胞。

3）小鼠分组，给予小鼠药物或免疫治疗等处理。

4）第 20 天给予小鼠安乐死，称取小鼠体重、肺重、解剖镜下观察肺部并计数瘤灶。

5）Bouin 固定液固定，作病理切片观察。

注意事项

1）小鼠尾静脉注射成功率较为关键，要保证注射成功并使每只小鼠的注射细胞量一致。注射时用固定装置固定小鼠，使之不能移动，并用局部加温、酒精擦拭、手指挤压等方法使静脉尽量鼓胀可以提高注射成功率。

2）因为 B16 细胞较大，且易于黏附成团，细胞团注射到动物体内容易引起动物栓塞而急性死亡，所以务必保证肿瘤细胞呈单个状态，消化时可以适当延长时间，细胞重悬后要用 70μm 孔径的无菌滤器过滤，除去细胞团。

3）消化时利用含有 EDTA 的胰酶消化，收集细胞后要用 PBS 洗涤 2 次，以去掉

EDTA，因 EDTA 对小鼠可以产生较大的毒性，但离心力不能太大，一般不要超过 200g，以免对细胞造成损害。

三、Lewis 肺癌自发性肺转移模型

Lewis 肺癌为未分化上皮样癌，Lewis 肺癌接种于皮下、肌肉、足垫等处，肿瘤易于侵袭到血管，进而播散到肺。此过程与人类肿瘤的生长及转移过程极为类似。Lewis 肺癌是目前研究肿瘤转移的首选模型。

材料与试剂

6～8 周龄 C57BL/6 小鼠

皮下接种 14d 的 Lewis 肺癌瘤体

1ml 注射器

Bouin 固定液

步骤

1）取皮下接种 14d 的 Lewis 肺癌瘤体，选择生长良好部分，加入生理盐水匀浆后，制备成 1×10^7 个细胞/ml 的悬液，备用。

2）用 1ml 注射器将瘤液 0.2ml/只的量注射于 C57BL/6 小鼠的腋窝皮下。

3）接种第 2 天开始给予药物或免疫治疗，第 28 天给予小鼠安乐死。

4）称取小鼠体重、肺重。用 Bouin 固定液固定后，在解剖镜下观察肺部并计数瘤灶，此时瘤灶呈白色，而肺组织为黄色。

5）用 Bouin 固定液固定的肺组织制备切片，镜下计数肿瘤或观察其形态。

注意事项

1）要将 Lewis 肺癌正规传代，选取生长能力好的肿瘤进行实验。

2）要给予小鼠加强营养，如喂饲鸡蛋等，以防止小鼠非正常性死亡。

3）肿瘤的转移成功与否与动物的免疫力直接相关，一般使用 6～8 周龄的小鼠，如果使用过老或过小的小鼠，发生转移的概率可能升高。

4）本方法对 B16 黑色素瘤高转移株自发性肺转移同样适用。

四、黑色素瘤脾内移植肝转移模型

脾静脉最后汇流入门静脉，因此将小鼠癌细胞移植入脾脏包膜下或脾血窦后，肿瘤细胞侵袭进入脾血窦，沿脾静脉、门静脉到达肝血窦，形成转移瘤。由于肝脏内转移瘤无法从器官表面观察到，所以一般观察荷瘤小鼠的生存期，及制作肝脏切片，在显微镜下观察计数转移瘤灶。

材料与试剂

6～8 周龄 C57BL/6 小鼠

皮下接种了 B16 黑色素瘤的小鼠

D-Hank's 液

10×消化液（胶原酶Ⅳ 0.5g/L，EDTA 0.08%，DNA 酶 0.5%）

乙醚或戊巴比妥等麻醉药

步骤

1）将皮下接种了B16黑色素瘤14d的小鼠安乐死，无菌取下瘤块，选取有活力的新鲜肿瘤组织，剪碎，转移到15ml离心管中，用D-Hank's液低速200*g*离心5min洗涤2次。

2）用Hank's液悬浮，加入10×消化液至1×的工作浓度，37℃消化20min，每5min用毛细吸管吹打一次，最后加入Hank's液洗涤2次，用70μm滤器过滤除去肿瘤团块。将细胞以Hank's液重悬至2×10^7个瘤细胞/ml，4℃备用。

3）麻醉小鼠，暴露脾脏区域，消毒后做小切口，暴露脾脏，用1ml注射器注入0.1ml瘤细胞入脾脏；或者无须切开腹膜，一手固定好脾脏后，另一手同样注射0.1ml瘤细胞入脾脏，分层缝合。

4）18d后，将小鼠安乐死，观察肝转移情况及荷瘤小鼠的生存期。

注意事项

1）为了减轻手术对小鼠生成肿瘤的影响，要尽量减轻手术创伤，尽量采用腹膜外注射的方法。

2）注意尽量防止注射时针孔漏液或出血，以免形成腹腔内接种。

3）制备瘤细胞时，消化时间不可过长，离心力不可过大，以防肿瘤细胞大量死亡。

五、小鼠Hep肝癌经脾内移植肝转移模型

材料与试剂

6～8周昆明小鼠

小鼠Hep肝癌细胞

乙醚或戊巴比妥等麻醉药

Bouin固定液

步骤

1）将处于对数生长期的Hep肝癌细胞1×10^6～2×10^6个注射小鼠腹腔，待腹水形成后，抽取荷瘤小鼠腹水，收集细胞，以PBS重悬细胞至1×10^8个细胞/ml。

2）麻醉小鼠，暴露左侧脾脏区域，无菌切口，暴露脾脏，以1ml注射器注射上述细胞0.01ml至脾包膜下或脾内。分层缝合。

3）14d后，给予小鼠安乐死，摘取其肝、脾、肺、肾、肝门淋巴结、肾门淋巴结，用Bouin固定液固定后，切片并染色后，显微镜下观察计数转移灶。或记录荷瘤小鼠的生存时间。

4）采用以下分级方法分级：0级，无转移；Ⅰ级，肝内1～2个0.2～0.5mm的转移灶；Ⅱ级，肝内有3～5个小转移灶或有1～2个0.5～1mm的转移灶；Ⅲ级肝内广泛转移。

注意事项

1）注射过程要注意无菌操作，注射时要避免液体或血液外流，否则将影响实验。
2）脾内注射肿瘤细胞，细胞可以直接进入脾血窦，进而随血液循环进入肝血窦，形成转移，而如果注射入脾包膜下，则肿瘤必须先在局部增殖，侵袭脾血窦，才能进入肝脏形成转移。前者形成转移灶需要的时间相对较短，转移率相对较高，实验室必须引起重视。
3）要对小鼠加强营养，防止意外死亡。

第六节　转基因动物肿瘤模型

转基因动物肿瘤模型是指通过 DNA 重组技术将外源性肿瘤基因或相关基因导入动物染色体基因组，使之稳定表达并遗传所产生的肿瘤模型。虽然转基因方法很多，但目前建立的转基因动物肿瘤模型主要采用纤维注射技术建立。这种方法建立的肿瘤模型较好地再现了人类肿瘤发生发展的完整变化，动物遗传背景明确，实验周期短，为深入研究肿瘤的发病机制与基因治疗提供了前所未有的条件。但是这种模型实验成本高，肿瘤的发生也参差不齐，部分转基因动物其生存能力及繁殖能力低，所以广泛的实验应用仍存在着诸多障碍。目前建立的转基因动物肿瘤模型以小鼠为主，如肝癌转基因动物模型、前列腺癌转基因动物模型、膀胱癌转基因动物模型、乳腺癌转基因动物模型等，不再赘述。

第七节　肿瘤模型的评价与免疫细胞研究

肿瘤模型的发展状况，除了可以通过动物的一般状况与体重反映外，通常通过测定体表肿瘤的生长曲线、肿瘤剥离时的瘤重、荷瘤动物的存活期等方面来评价。当然，在肿瘤免疫学研究中，还经常通过观察肿瘤内及其周围组织浸润的免疫细胞来研究肿瘤的形成与发展机制、逃逸机制以及机体的免疫状况。

一、肿瘤的大小和瘤重

肿瘤大小的观察适用接种于皮下的肿瘤，在观察肿瘤生长曲线时，一般每 2d 用游标卡尺测量肿瘤一次，测量最长径为长，最短径为宽，以下列公式："肿瘤的体积＝长×宽^2/2"来计算。在实验结束时称量瘤重，需要先使动物安乐死，剥离肿瘤，去掉肿瘤外周包膜，称重。

二、荷瘤动物的存活期

观察荷瘤动物的存活期是测评药物或免疫治疗等因素对肿瘤效应的一个非常重要的指标，因为研究肿瘤的最终目的就是要提高癌症患者的存活时间。在应用小鼠进行实验

时，如果确定肿瘤模型的成功率为100%，一般认为，从接种肿瘤时算起，小鼠存活超过90d，可看做长期存活。

三、实体肿瘤组织内单个核细胞的分离

随着免疫学的发展，肿瘤免疫学已成为研究肿瘤发病机制与生长发展的重要手段，分离实质性肿瘤局部及其周围组织的免疫细胞，并对这些细胞进行细致的表型及功能分析显得非常重要。但是，由于肿瘤的来源不同、组织类型不同等原因，其质地、密度等差别巨大，对于源于特殊部位的肿瘤，如骨癌、肝癌等其内单个核细胞的分离可以参照从正常骨中或肝脏中分离单个核细胞的方法进行。下面列举了一种常用的能够分离大部分实质性肿瘤内及周围组织内单个核细胞的方法。

材料与试剂

肿瘤组织样本

Hank's 液和 D-Hank's 液

10×消化液（胶原酶Ⅳ 0.5g/L，DNA 酶 0.5%）

33%的等渗 Percoll 密度分离液（用 NaCl 配制）

Tris-NH_4Cl 红细胞裂解液

50ml 离心管

步骤

1）将手术摘除的肿瘤组织剪碎（1mm×2mm 大小），以 D-Hank's 液洗涤 2 次。

2）以 Hank's 液重悬肿瘤组织，加入 10×消化液至 1×工作浓度。37℃消化 20min 至 2h。期间，应搅拌数次，或者在搅拌器缓慢搅拌下消化。

3）将消化后的瘤组织在 100 目的钢网上用橡胶棒轻轻研碎，将细胞悬液转移到 50ml 离心管中。

4）以 D-Hank's 液洗涤 2 次，500g 离心 5min。

5）如果有大量红细胞存在，用 Tris-NH_4Cl 溶液破红，D-Hanks 洗涤 1 次。Hank's 液 20ml 重悬瘤细胞。

6）在 50ml 离心管内加入 33%的 Percoll 20ml，小心在其上加入上述 20ml 细胞悬液，500g 离心 30min。

7）吸弃上层悬浮细胞及液体，收集离心管底的细胞，即为肿瘤组织中的单个核细胞。Hank's 液洗涤后备用。

注意事项

1）对于来源于人类或者通过化学诱导、病毒感染等途径得来的肿瘤组织样本，实验时必须加强防护，防止直接沾染。

2）由于各种组织其存在的胶原类型不同，可以根据情况适当更换其他类型胶原酶，或者也可以加入透明质酸酶来辅助消化。

3）应根据获得肿瘤组织的质地适当控制消化时间，如硬度较大则延长至 2h，硬度低则缩短。消化充分与否对于能否成功分离单个核细胞非常重要。

4）所应用的 Percoll 工作液必须用 8.5％和 0.85％的 NaCl 配制成等渗溶液，否则将对细胞造成损害，甚至使细胞破裂死亡。

5）如果获得的肿瘤组织硬度极低，可以将肿瘤剪碎后，用 0.05％的胰酶，含 0.008％ EDTA、0.05％ DNA 酶的消化液进行短时间（5～10min）消化，并用毛细滴管吹打，洗涤后即可用 Percoll 进行下一步分离。

6）如果需要消化时间较长，必须使用 Hank's 液（含钙镁）悬浮细胞，而不要使用无钙镁 PBS 或 D-Hank's 液，以保证细胞活力。

7）对于特殊的组织如肾组织，因肾细胞的密度与单个核细胞的密度相近，所以不能用此法分离。笔者已经验证此法适用于分离如肺癌、肝癌、黑色素瘤、结肠癌、前列腺癌等多种肿瘤内及其周围组织的单个核细胞。

（张明刚）

参考文献

高进，章静波．2003．癌的侵袭与转移基础与临床．北京：北京科学技术出版社，35～65.

李才．2008．人类疾病动物模型的复制．北京：人民卫生出版社，82～123.

吴细丕，钱林法．2000．实验动物与肿瘤研究．北京：中国医药科技出版社，94～200.

周光兴，高诚，徐平，等．2008．人类疾病动物模型复制方法学．上海：上海科学技术文献出版社，363～391.

Han YM，Guo QL，Zhang MG，et al. 2009. CD69+ CD4+ CD25-T cells，a new subset of regulatory T cells，suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. J Immunol，182（1）：111～120.

Jin H，Yang R，Fong S，et al. 2004. Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival. Cancer Res，64（14）：4900～4905.

Li HQ，Han YM，Guo QL，et al. 2009. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. J Immunol，182（1）：240～249.

Raskopf E，Dzienisowicz C，Hilbert T，et al. 2005. Effective angiostatic treatment in a murine metastatic and orthotopic hepatoma model. Hepatology，41（6）：1233～1240.

Struyf S，Burdick MD，Peeters E，et al. 2007. Platelet factor-4 variant chemokine CXCL41 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis. Cancer Res，67（12）：5940～5948.

Yang HZ，Cui B，Liu HZ，et al. 2009. Blocking TLR2 activity attenuates pulmonary metastases of tumor. PLoS One，4（8）：e6520.

第三十四章　转基因动物的建立

第一节　概　　述

一、转基因动物的概念及发展史

转基因动物（transgenic animal）是在经典遗传学、分子遗传学、结构遗传学和DNA重组技术的基础上，通过实验方法人为地将人们所需要的目的外源基因导入某种动物的受精卵或早期胚胎细胞，使外源基因与动物自身的基因组整合、随细胞的分裂而增殖并能正常表达和稳定地遗传给子代的一类动物。其实质就是按人们的需要有计划、有目的、有预见地改造动物的遗传组成，赋予转基因动物新的特征。

1974年，Jaenisch和Mintz将纯化的猴病毒40（Simian virus，SV40）DNA显微注射到小鼠胚泡的囊胚腔并将其植入假孕小鼠输卵管，在世界上首次成功地获得了SV40转基因小鼠。此小鼠组织中可以检出病毒DNA序列，说明外源性DNA已整合到小鼠胚胎细胞。1976年，Jaenisch等又发现用莫洛尼小鼠白血病病毒（Moloney murine leukemia virus，M-MuLV）感染小鼠胚胎，病毒DNA可以稳定地整合到小鼠生殖细胞系并传给子代。1980年，Gordon等首次成功地将含有单纯疱疹病毒胸苷激酶（HSV tk）和SV40 DNA片段的重组质粒DNA用显微注射法注入小鼠受精卵的雄原核内，得到了带有这种外源DNA序列的转基因小鼠。1982年，Palmiter将大鼠生长激素基因导入小鼠受精卵的雄原核内，得到基因组中整合有该基因的转基因小鼠，其体重远远大于正常小鼠，被称为“超级小鼠”（supermouse）。1988年，Pittius等首次报道在小鼠的乳腺组织中表达了人的组织纤溶酶原激活因子（human tissue plasminogen activator，tPA）基因，为在动物体内生产药用蛋白奠定了基础。近20年来，随着分子生物学及生物工程技术的不断发展，多种转基因动物已相继产生。转基因动物成为生命科学研究和开发的重要领域，并逐渐成为一类极具发展前景的高新技术产业。

二、转基因动物技术

转基因技术是借助于基因工程技术将体外重组的结构基因导入受精卵或胚胎，培养出转基因动物的技术。转基因动物技术被公认为是遗传学研究中继20世纪初的连锁分析、60年代的体细胞遗传、70年代的基因克隆之后的第4代技术。该技术通过基因重组等各种方法人为地改造动物基因组，并在动物活体水平上研究有关基因的结构和功能，为从分子到个体多层次、多方位地研究基因提供了新的方法和思路，并可按人类的意愿改造和修饰物种。

转基因动物技术的基本原理及过程是：将经过基因工程获得或改造过的外源基因，用不同的基因转移方法导入供体动物的受精卵或早期胚胎细胞，然后将此受精卵或早期胚胎细胞移植入代孕母体动物的输卵管或子宫中，使其发育成熟，产下子代，通过鉴定筛选获得携带并能稳定遗传外源基因的转基因动物。

第二节　转基因动物的外源目的基因的设计与构建

外源目的基因的获得是建立转基因动物的关键一步。为了实现不同的实验目的，外源基因一般需要经过适当的设计、改造和构建，将拟转移至动物体内的外源人工构建的功能基因与相关调控序列拼接，以期转入基因在动物体内正确表达，从而产生相应的表型。本节对目的基因设计与构建中需考虑的一些关键问题进行简单的阐述。

目的基因的种类和大小，根据基因转移方法的不同，也存在差异。其中原核显微注射法介导的基因种类可以是单基因、多基因甚至微染色体，而逆转录病毒能够负荷携带的外源基因片段一般不超过10kb。

外源目的基因主要由结构基因及其调控序列如启动子与增强子等组成。不同的启动子其调控基因表达的能力和组织细胞表达谱均不一样。CAG（CMV early enhancer/chicken β actin）、UBC（ubiquitin C）、PGK（phosphoglycerate kinase）等启动子可诱导目的基因广谱组织表达，而有些启动子则是组织细胞特异性表达。如果对转录调控元件不清楚，则应尽可能构建一个长的目的基因，以使之包含应有的调控元件。构建好的目的基因表达载体应先通过转染相应的真核细胞，观察目的基因的表达效果以便进一步的改造。

在构建目的基因表达载体时，常加入红色或绿色荧光蛋白基因、氯霉素乙酰基转移酶基因（chloramphenicol acetyltransferase，CAT）及LacZ等报道基因来监测转基因的表达情况。报道基因可与编码序列融合或者利用内核糖体进入序列（internal ribosome entry site，IRES）序列来实现同时表达。

根据目的基因性质需添加不同的辅助序列。如果目的基因产物是分泌型蛋白，需要加上信号肽序列；如果目的基因产物定位于细胞内的某个亚细胞器，则需要加上相应的细胞器定位序列。

一般线性的DNA片段比环状或超螺旋的DNA片段的整合率高。在目的基因构建过程中的一些转基因旁侧载体序列，应尽可能通过合适的限制性内切核酸酶酶切并纯化后去除，以减少非目的基因DNA片段的影响，得到线性化后的转基因DNA片段，用来进行基因转移。

第三节　转基因动物的常用转基因方法

建立转基因动物的转基因方法主要包括：①显微注射法；②逆转录病毒载体法；③胚胎干细胞介导法；④精子载体法；⑤其他方法，包括原生殖细胞介导技术、转基因

克隆动物技术。

一、显微注射法

原核显微注射法（pronuclear microinjection）是将在体外构建并纯化的目的基因在显微操作仪下直接注射到单细胞受精卵的原核中，当受体动物的受精卵在进行 DNA 合成时，把外源基因整合到基因组中。该方法由 Gorden 等于 1980 年在小鼠试验成功。

原核显微注射法的主要实验程序如下：①显微注射样品的预处理：基因 DNA 片段的酶切、纯化与定量。②准备假孕母鼠（受体鼠）：将可育雌鼠与输精管结扎后绝育的雄鼠交配，刺激雌鼠发生一系列妊娠变化而得到假孕母鼠作为受精卵转基因后的养母。③受精卵的准备：可育雌鼠注射孕马血清与绒毛膜促性腺激素（HCG）促使超排卵。处理后与可育雄鼠交配。次日从输卵管内收集受精卵备用。④基因导入：用显微注射装置将目的基因溶液注射入受精卵雄性原核内。⑤胚胎移植：将已转入目的基因的受精卵植入假孕母鼠的输卵管内，使胚胎在养母体内发育成熟。⑥对幼鼠的鉴定和建系。显微注射法简化的实验过程如图 34-1 所示。

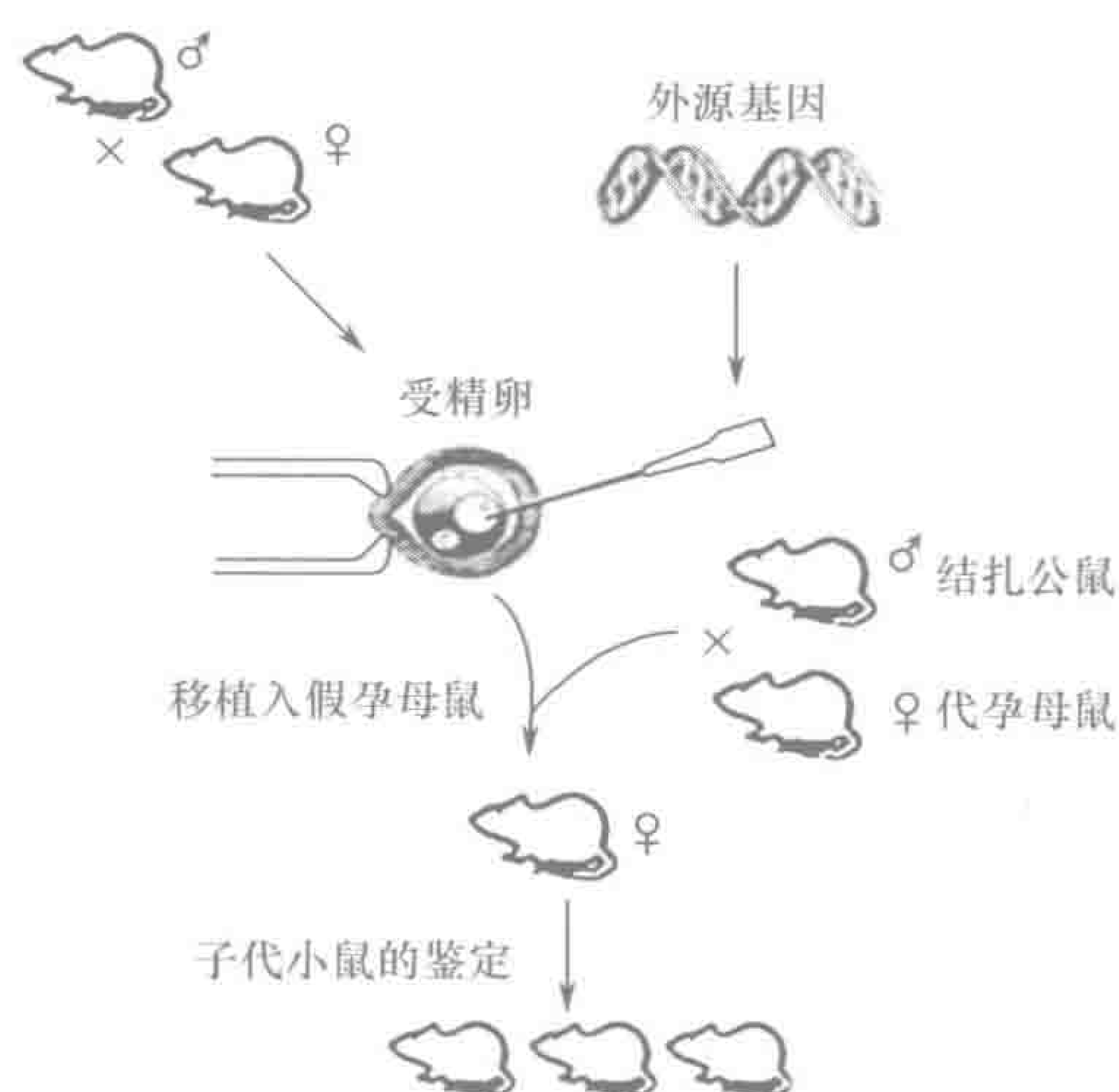


图 34-1　显微注射法建立转基因小鼠的过程

显微注射法的优点是可以把不同长度的重组 DNA 片段注入原核，不需载体；整合效率较高；可获得非嵌合体纯系动物；基因导入速度快，实验周期短，是制作转基因动物时应用比较广泛、效果比较稳定的方法。但此法仪器昂贵，技术操作较难；外源基因的整合位点和拷贝数无法控制，转基因为单复本或复本首尾串联成多联体；可造成动物的基因突变，有时可造成严重生理缺陷；这种方法的应用时期有限，完全不适用于后期胚胎细胞。显微注射法由于对外源基因大小的要求不受限，已广泛应用于研究整体动物内的基因功能、建立疾病动物模型及制备转基因大动物生物反应器等。

二、逆转录病毒载体法

逆转录病毒载体是 20 世纪 80 年代发展起来的基因转移系统。外源基因被插入逆转

录病毒的基因组中，包装成高浓度病毒颗粒，通过病毒感染宿主细胞，把外源基因整合到受体基因组中。

逆转录病毒感染的方法有 3 种：第一种是在动物早期胚胎的培养液中加入重组病毒颗粒，第二种是把胚胎放入病毒包装细胞培养物中培养，第三种是把重组病毒颗粒注入囊胚腔中获得转基因动物。

逆转录病毒载体法在制备转基因动物方面应用广泛，是外源基因导入早期胚胎的有效方法。其优点有：①逆转录病毒的宿主范围广泛，适用于多种动物；②感染率高，100%的细胞可被感染，且细胞损伤较少，胚胎成活率较高；③病毒 DNA 常单拷贝随机整合；④外源基因在宿主染色体 DNA 的整合位点附近较少发生缺失和重排，因此转基因动物中也较少出现不育或其他生理异常现象。逆转录病毒载体法也有其缺点：①逆转录病毒载体的容纳量在 10kb 以内，所以不能插入较大的外源基因；②逆转录病毒不够稳定，外源基因易在病毒复制过程中发生重排或丢失；③整合效率不高，特别是不易整合到生殖细胞中，需要在 8 细胞胚胎期以前进行病毒感染。

三、胚胎干细胞介导法

胚胎干细胞（embryotic stem cell，ES cell）是从早期胚胎的囊胚内细胞团中分离出来，经体外抑制分化培养建立起来的发育全能细胞系。当 ES 细胞转移入受体囊胚后，能参与包括生殖腺在内的各种组织器官的发育。通过各种转基因方法（显微注射、电穿孔、逆转录病毒感染等），将外源基因导入 ES 细胞，然后筛选（PCR 法、选择性培养基、药物法等）出有外源基因表达的 ES 细胞，将其转移入动物囊胚，参与胚胎发育和生殖细胞的形成，形成嵌合体转基因动物。

细胞内具有相似核苷酸序列的 DNA 片段之间，可以相互配对并发生交换，称为 DNA 的同源重组。定点整合就是将外源 DNA 序列导入受体细胞，并使其与受体细胞内的同源片段发生重组，整合在预定的位点上，实现基因的定点突变或缺失，这一技术被称为基因打靶（gene targeting）。通过 ES 细胞的基因修饰包括引进新的基因和基因打靶（包括定点突变或缺失），从而制备转基因动物（包括基因打靶动物），这一新技术已是目前精确地改造哺乳动物基因组的最有效方法。

小鼠胚胎干细胞（ES）介导法的具体步骤如下。

1）ES 细胞系的建立。

2）构建含有外源基因的具有正负双向筛选标记的载体。

3）通过显微注射、电穿孔、逆转录病毒感染等将外源基因导入 ES 细胞。

4）阳性 ES 细胞克隆的筛选和定点整合的检测。

5）结扎的雄性小鼠、供胚小鼠、假孕小鼠的准备。

6）胚胎的收集和培养。

7）将整合有外源基因的 ES 细胞显微注射至供胚小鼠的囊胚内。

8）将注射过 ES 细胞的胚胎移植至假孕小鼠的子宫内继续发育。

9）对得到的嵌合体子代鼠进行鉴定和建系。

ES 细胞介导法最明显的优点是可实现外源基因的定点整合，且整合率高，减少了

显微注射法等随机整合所致的多因素影响。但其缺点是ES细胞系不易建立，特别对于大动物。得到的转基因动物多为嵌合体，需要杂交多代，实验周期较长。

四、精子载体法

上述三种方法都是利用受精卵或早期胚胎作为转基因的受体，操作比较复杂。因此，很多研究机构在寻求更简单有效的方法，以精子作为载体介导基因转移便是其中的一种。

1971年Brackett等将兔精液在^{3}H-胸腺嘧啶标记的SV40病毒DNA中孵育后，可在精子的头部检测到放射活性，证明外源基因可进入到成熟哺乳动物的精子细胞中；进一步研究发现外源性DNA在受精过程中可被精子带进卵细胞内。Lavitrano等（1989）首先报道用与外源基因溶液共孵育过的鼠精子建立了转基因小鼠，并有30%的子代小鼠携带外源基因，但此后很多实验室未能重复出该结果。Rottman等对上述精子载体法进行了改进，将外源DNA在与精子共同孵育之前用脂质体包埋，脂质体与DNA相互作用形成脂质体-DNA复合体，这种复合体比较容易和精子细胞膜融合，从而进入细胞内部。这种改进以后的精子载体法在转基因鸡的制作上获得了满意的结果，转基因阳性率为26%。但实验显示外源DNA并未整合进宿主基因组，而是以附加体的形式存在于染色体之外。

利用精子作为DNA转移的载体，在实践中还存在很多问题，未取得可重复的理想结果。还需进一步的研究探索，改进技术方法。但这一技术对转基因动物理论和应用都具有较重要的意义，有可能成为一种简单有效的转基因动物方法。该方法的主要步骤如下。

1）外源基因导入精子：如DNA与精子共育法、脂质体转染法、电穿孔法等。

2）体外受精。

3）胚胎移植：将导入外源基因的受精卵用手术方法移植入假孕受体输卵管内。

4）子代鉴定分析。

五、其他方法

Kim等（1997）建立了利用小鼠精原干细胞转染外源基因的新方法，其原理是将外源基因转染到曲精管内的精原干细胞，使其整合到干细胞的基因组中，由干细胞分化成熟的精子及受精后的受精卵将可能携带外源基因，其产生的子代就携带有外源基因。该方法可能成为动物基因转移的一条简便可行的新方法。

转基因克隆动物技术是转基因动物技术与动物克隆技术相互结合的结果。它是以动物体细胞（包括成体体细胞、胎儿成纤维细胞等）为受体导入外源基因，再以这些体细胞为核供体，进行动物克隆。采用简便的体细胞基因转染技术实现目的基因的转移，可以避免生殖细胞基因导入的低效率及培养困难。Schnieke等（1997）报道用胚胎细胞为核供体获得了表达治疗人血友病的凝血因子Ⅸ的转基因克隆绵羊“多莉”，使得以转基因体细胞为核供体制作克隆动物成为现实。体细胞克隆山羊、奶牛等相继获得了成功。转基因动物克隆技术将有望成为21世纪创建遗传工程的动物的主导技术。

第四节　转基因动物的鉴定

转基因动物获得后，需通过从不同水平检测鉴定外源目的基因的整合、转录、表达情况及其由目的基因产生的生物学效应，以便进行后续的研究。

一、目的基因的整合鉴定

取尾尖、脚趾为材料，提取基因组 DNA 用于聚合酶链反应（PCR）、Southern 印迹杂交、斑点杂交等方法，以确定所转入的基因是否整合、整合的拷贝数及排列顺序等，用染色体原位杂交技术检测整合位点。

（一）PCR

PCR 检测基因整合具有简便、快速、灵敏度高等优点，目前已广泛用于转基因动物的初步筛选。另外用 PCR 先对着床前的胚胎予以筛选，再将已证实携带有外源基因的胚胎植入母体，可大大提高转基因效率。

PCR 引物的特异性是鉴定正确的保证。由于哺乳类动物基因组 DNA 的同源性也较大，除需遵守引物设计的一般原则外，尚需考虑以下因素。

1）如果导入的目的基因是融合基因，可将引物设计在来自不同基因的片段中，提高特异性。或将上游引物设计在启动子中，下游引物设计在目的基因中。

2）导入的目的基因和内源基因的编码区同源性很高时，可将引物设计跨越在该内含子的两端，使导入的目的基因和内源基因扩增产物的长度不同，由此判断目的基因的整合与否。

3）可设计 2 对或 2 对以上处于不同序列位置的 PCR 引物，进行确认。

4）对 PCR 产物测序，更直接地判断目的基因是否整合。

（二）Southern 印迹杂交

Southern 印迹是将变性 DNA 样品经过酶切、电泳分离后转移到硝酸纤维素膜（或尼龙膜）上，再与核酸探针杂交，检测样品中是否存在目的基因 DNA 序列的方法。

Southern 印迹杂交操作复杂，但较 PCR、斑点杂交获得的信息量大，可确定目的基因是否整合、整合是否完整、分析拷贝数以及排列方式等。主要用于以下几个方面。

1）纯合子动物的筛选：对所导入目的基因的杂交强度进行标准化后比较，如果是纯合子，其杂交信号是杂合子的 2 倍。

2）拷贝数测定：基本原理是在杂交实验中设置一系列标准阳性对照，然后将待测样品的结果和阳性对照比较，进而确定转基因整合的拷贝数。

3）目的基因排列方式及整合完整性的测定：选择一种在所导入目的基因片段中只有一个酶切位点且不在中间位置的限制性内切核酸酶，对 DNA 链进行酶切分析。如果所导入目的基因片段以头-头、尾-尾相接，将产生比所导入目的基因长和短的两种片段；如果以头-尾相接，将产生与所导入目的基因同样大小的片段。

（三）斑点杂交

斑点杂交是直接将变性的DNA样品点样于尼龙膜或硝酸纤维素膜上，然后和标记的探针杂交，从而检测样品中是否存在所导入目的DNA序列。

斑点杂交鉴定转基因动物有许多优点：灵敏度高，处理样品多，操作较Southern印迹杂交简便，结合灰度扫描仪或γ计数仪可以测定外源基因的拷贝数。其缺点是特异性较差，有假阳性，尤其是在所导入的目的基因和内源基因同源性较高时。该方法适用于大批转基因动物初步筛选。

（四）染色体原位杂交技术

染色体原位杂交技术的原理是利用碱基互补的原则，以放射性核素或非放射性材料标记的DNA片段作为探针，与染色体标本上的基因组DNA进行原位杂交，经放射自显影或非放射性检测体系在显微镜下直接观察目的DNA片段在染色体上的位置。本方法是确定所导入目的基因在染色体上确切位置的重要手段。

二、目的基因转录水平的鉴定

通过对转基因动物的基因转录水平的检测可以了解目的基因表达与否及其强弱。

（一）Northern印迹杂交

Northern印迹杂交是将提取的组织或细胞RNA通过变性琼脂糖凝胶电泳进行分离后，再转移至硝酸纤维素膜上，用放射性核素或非核素标记的DNA或RNA特异性探针与固定在膜上的mRNA进行杂交，洗膜除去非特异性杂交信号，通过放射自显影或其他显色技术对特异的杂交信号进行检测分析。

该方法可分析目的基因转录产物的大小；通过比较杂交信号的强弱，可判断目的基因表达的强弱，但如果外源目的基因和内源基因同源性较高时，该方法容易出现假阳性。

（二）逆转录-聚合酶链反应

逆转录-聚合酶链反应的原理是以总RNA为模板，用oligo（dt）作为逆转录引物逆转录出cDNA，然后以该链为模板，以特异性引物进行PCR，检测外源目的基因是否表达。具体操作步骤参照第十七章。

提取RNA时应防止DNA污染。RNA样品可用DNase消化以去除DNA。RT-PCR引物设计时应跨过一个内含子以排除DNA污染造成的假阳性结果。

（三）RNase保护性分析

RNase保护性分析的基本原理是用核素标记的RNA探针和待测RNA样品进行杂交。如果二者的同源性不同，形成的杂交体结构也不同。完全同源时，形成完全互补的双链杂交体；同源性降低时，杂交体因不完全互补形成大小不等的单链环。用RNase处理杂交体时，完全互补的杂交体不被水解，而未杂交的单链和杂交体中的单链环则被水解。放射自显影后可得到不同长度的带型，从而鉴定转基因动物中目的基因所转录的

RNA。此法的灵敏度很高，可以区分同源性很高的 RNA。常用于与内源性基因有较高同源性的或低丰度的外源目的基因的转基因动物的鉴定。

三、目的基因翻译水平的鉴定

基因的功能最终依靠其编码的蛋白质来发挥。检测转基因动物组织细胞内目的基因所编码蛋白质的表达情况是最可靠的手段。主要方法有 Western 印迹、免疫组织化学和酶联免疫吸附试验（ELISA）等。

（一）Western 印迹

蛋白质样品通过聚丙烯胺凝胶电泳分离后，转移至硝酸纤维素膜上，利用特异性抗体，与膜上的蛋白质抗原发生特异性结合。再用辣根过氧化酶偶联的二抗及相应的显色底物进行检测，从而对特定的蛋白质进行鉴定和定量。

（二）免疫组织化学

适用于转基因动物组织及细胞目的基因所编码的蛋白质表达情况的分析。

（三）ELISA

可检测转基因动物分泌至血液或体液中的目的基因所编码的分泌性蛋白。

四、目的基因生物学效应及转基因动物表型的鉴定

在转基因动物的培育过程中，需要对转基因动物进行全面观察分析，包括体型、毛色改变、生长速度、生育能力、抗特定病原的能力及视听觉反应性等，进一步了解目的基因表达产物所引起的效应和表现。

（一）目的基因整合造成宿主细胞基因突变而引起的生物学效应

外源基因整合于宿主动物的基因组时，可能会引起宿主染色体的插入突变、缺失突变或移码突变等。例如，外源基因整合在 X 或 Y 染色体上引起的插入突变可能造成不育。因此，当转基因动物出现新表型时，应仔细鉴别此表型的产生是由于外源基因表达还是基因组突变的结果。

（二）目的基因表达产物所致的生物学效应

外源目的基因在转基因动物中成功表达后，可能会出现预期的与该基因所具有的功能相符的病理生理表型，但也可能只出现轻度的或部分的表型，或者可能出现与预期不符的表型。此时需要进行全面的评估和分析。

第五节　转基因动物的育种及建系

在转基因动物鉴定后，需要进行相应的育种，以及建立整合有外源基因的稳定转基因动物品系。例如，首建（founder）小鼠获得以后，再使之与同一个品系的正常小鼠交配，

检测子代小鼠的阳性率。当阳性率约为50%时，即基本上可以判断出外源基因的整合位点为单一位点。再在子代中选择出外源基因表达效果佳、适应性好的转基因小鼠，进行近亲交配，以获得纯合子。将纯合子回交10代左右，可得到稳定的转基因小鼠品系。

能否培养成功稳定的转基因动物品系，这与外源基因整合至宿主染色体DNA的时机、整合的位点数和整合的具体位置密切相关。如果外源DNA整合发生于受精卵的单细胞期，则转基因小鼠的体细胞和生殖细胞都将会有导入的外源基因；如整合发生于后期细胞分裂时，则将产生嵌合体转基因小鼠，其生殖细胞内不含有外源基因，不能遗传给子代。转基因小鼠经常在每个细胞内均有许多个拷贝的外源基因，以串联形式随机整合于一个染色体位点上，当将这样的转基因小鼠与正常小鼠进行回交，其50%的子代中将遗传有外源基因。如果一个转基因小鼠有多个外源基因整合位点的情况，这种鼠与正常小鼠回交后产生的子代中，携带外源基因的小鼠的阳性率将超过50%。

第六节 转基因动物的应用

一、转基因动物用于生命科学研究

（一）研究基因功能

转基因动物是用于研究基因调控及基因功能的理想模型。通过转基因动物，可从整体及体内水平上研究目的基因表达水平、组织表达特异性以及所引起的生理效应，具有较高的真实性。另外，还可用不同的单基因转基因小鼠，通过杂交产生双基因转基因小鼠，用来研究两种基因间的相互作用及其功能。

（二）研究生物的发育过程

转基因动物是一个四维时空体系，可以利用它来研究某些与发育相关基因的功能，探讨其时空表达的特异性、组织表达的特异性以及如何控制胚胎发育过程中组织细胞的发育和分化。

（三）在免疫学研究中的应用

转基因小鼠已成为从整体水平研究各种免疫现象的重要工具，如抗原提呈、抗体产生、免疫细胞的发育、先天性及获得性免疫应答的调节、细胞因子及其受体的作用等。许多研究结果已为免疫应答、免疫耐受、自身免疫性疾病发生等提供了充分的研究依据。

二、转基因动物用作研究人类疾病的发病及治疗的实验模型

（一）病毒性疾病的转基因动物模型

转基因动物是可在活体研究病毒的非常理想的工具。转基因动物主要适用于研究流行性强、宿主范围又很窄的病毒。例如，乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus，HBV）转基因小鼠的建立，为HBV的发病机制研究提供了有价值的动物模型。

（二）肿瘤的转基因动物模型

癌基因如 Ras 等转基因小鼠的问世，使癌基因功能可在整体水平被观察，为肿瘤学研究提供了新的手段。通过给肿瘤转基因鼠使用化疗或反义核酸治疗等，可研究药物及各种治疗手段的效果。

（三）遗传性疾病的转基因动物模型

以往遗传性疾病的动物模型，主要依靠基因自发突变的动物。通过随机突变、插入突变及定点整合的转基因技术建立的转基因动物模型，为研究单基因遗传性疾病的整体发病机制以及观察药物作用的效果奠定了基础。

（四）其他疾病的转基因模型

在其他疾病中，如过敏性疾病，都可利用转基因模型来研究其目的基因在该疾病的发病机制、病理过程以及观察药物的治疗效果。

三、转基因动物作为生物反应器生产药用蛋白

用转基因动物来大量生产医药用的蛋白质和多肽，如抗体、疫苗、激素、多肽、细胞因子等，是医药产业的一场革命。外源基因在动物体内特异部位高效表达后，通过提取及纯化获得这些基因的表达产物可作为药用蛋白并应用于临床。这类转基因动物就像活体的生物工厂，因而被称为生物反应器。用生物反应器制备的药用蛋白具有天然生物活性，纯度高，比传统的基因产品制备生产程序简单，具有不受来源限制、没有污染等优点。

四、转基因动物在异种器官移植研究中的应用

器官移植已成为许多慢性病器官功能衰竭的终极疗法。随着手术方法及免疫抑制剂的不断发展，移植成功率和移植物的存活率有了明显的提高，但供体器官的严重短缺成为器官移植治疗的最大障碍，使人们不得不转移到异种移植的研究上。目前，异种移植仍面临许多问题，如超急性排斥反应。但转基因动物在异种移植研究中已取得了很大的进展。相信在未来的研究中，借助于转基因技术，有可能通过植入的异种器官表达出能控制排斥反应的基因产物，形成器官局部的免疫耐受，从而消除免疫排斥。

（刘星光）

参考文献

陈永福. 2002. 转基因动物. 北京：科学出版社.

沈关心，周汝麟. 2002. 现代免疫学实验技术. 第二版. 武汉：湖北科学技术出版社.

张健. 2009. 转基因动物技术. 北京：科学出版社.

Brackett BG，Baranska W，Sawicki W，et al. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. Proc Natl Acad Sci USA，68（2）：353～357.

Chen AWS，Homan EJ，Ballon LV，et al. 1998. Transgenic cattle producted by reverse transcribed gene transfer in

oocytes. Proc Natl Acad Sci USA，95 (22)：14028～14033.

Cid-Arregui A，Garcia-Carranca A. 1998. Microinjection and Transgeneds：Strategies and Protocols. Germany：Springer.

Gordon JW，Scangos GA，Plotkin DJ，et al. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci USA，77 (12)：7380～7384.

Jaenisch R，Mintz B. 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. Proc Natl Acad Sci USA，71 (4)：1250～1254.

Jaenisch R. 1976. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. Proc Natl Acad Sci USA，73 (4)：1260～1264.

Joyner AL，Bernstein A. 1983. Retrovirus transduction：Generation of infections retroviruses expressing dominant and selectable gene is associated with in vivo recombination and deletion events. Mol Cell Biol，3 (12)：2180～2190.

Kim JH，Jung HH，Lee HT，et al. 1997. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. Mol Reprod Dev，46 (4)：515～526.

Lavitrano M，Camaioni A，Fazio VM，et al. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs：Genetic transformation of mice. Cell，57 (5)：717～723.

Lavrovsky Y，Sollg CS，Chatterjee B，et al. 1998. A rapid and reliable PCR-based assay for gene transmission and sex determination in newborn transgenic mice. Transgenic Res，7 (4)：319～320.

Palmiter RD，Brinster RL，Hammer RE，et al. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with a metallothionein-growth hormone fusion gene. Nature，300 (5893)：611～615.

Pinkert CA. 1994. Transgenie Animal Technology：A Laboratory Handbook. San Diego：Academic Press.

Pittius CW，Hennighausen L，Lee E，et al. 1988. A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA，85 (16)：5874～5878.

Richa J，Lo CW. 1989. Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected Chromosome fragments. Science，245 (4914)：175～177.

Schnieke AE，Kind AJ，Ritchie WA，et al. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science，278 (5346)：2130～2133.

Wei CM，Gibson M，Spear PG，et al. 1981. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. J Virol，39 (3)：935～944.

第三十五章　基因敲除动物的建立

第一节　概　　述

一、基因敲除动物

基因敲除动物是指通过基因工程的方法使动物体内某种基因功能缺失，并能稳定遗传给子代的一类动物。它是以胚胎干细胞分离培养及同源重组技术为基础建立起来的。1989 年，Capecchi 等通过 ES 细胞同源重组培育出了第一只基因敲除小鼠。2007 年，M. R. Capecchi、O. Smithies 和 M. J. Evans 因在建立基因敲除技术中的卓越贡献获得了当年的诺贝尔生理学或医学奖。

二、基因敲除技术

1987 年，Capecchi 研究小组实现了导入的外源基因在 ES 细胞染色体 DNA 上的定点整合，这一技术称为“基因打靶”，即指外源 DNA 片段上带有与受体细胞染色体相应部位的同源序列，导入 ES 细胞后在同源部位通过同源重组发生定点整合。基因敲除（gene knock out）技术是指从基因水平上将一个基因去除、替代或使其失活突变，然后从整体水平观察实验动物，推测相应基因功能的实验方法，其技术基础就是“基因打靶”。

通常意义上的基因敲除技术的基本原理是：首先选定需要突变的靶基因的全部或部分 DNA 序列，通过插入、修饰、剔除或置换等手段使其突变，构建靶载体，再将靶载体导入动物 ES 细胞中，使之与细胞染色体内同源的靶序列进行同源重组。然后在细胞水平和分子水平筛选富集发生突变的 ES 细胞，并将其注射到动物囊胚腔内，将这些囊胚植入假孕母体动物子宫中，产下携带有该突变基因的子代动物。目前，动物中基因敲除技术最成功和完善的是小鼠。在本章中，也主要介绍小鼠基因敲除模型。随着基因敲除技术的发展，新的原理和技术也逐渐被应用，如基因捕获法和转座子法等。

第二节　基因敲除动物的建立方法

一、利用基因同源重组进行基因敲除

利用同源重组构建基因敲除模型的基本技术路线为：①基因敲除载体的构建；②ES细胞的体外培养；③将载体导入 ES 细胞；④筛选鉴定重组成功的 ES 细胞；⑤ES 细胞注射入囊胚；⑥囊胚移植入受体鼠；⑦嵌合体杂交育种（图 35-1）。下文对上述基本步骤进行具体的阐述。

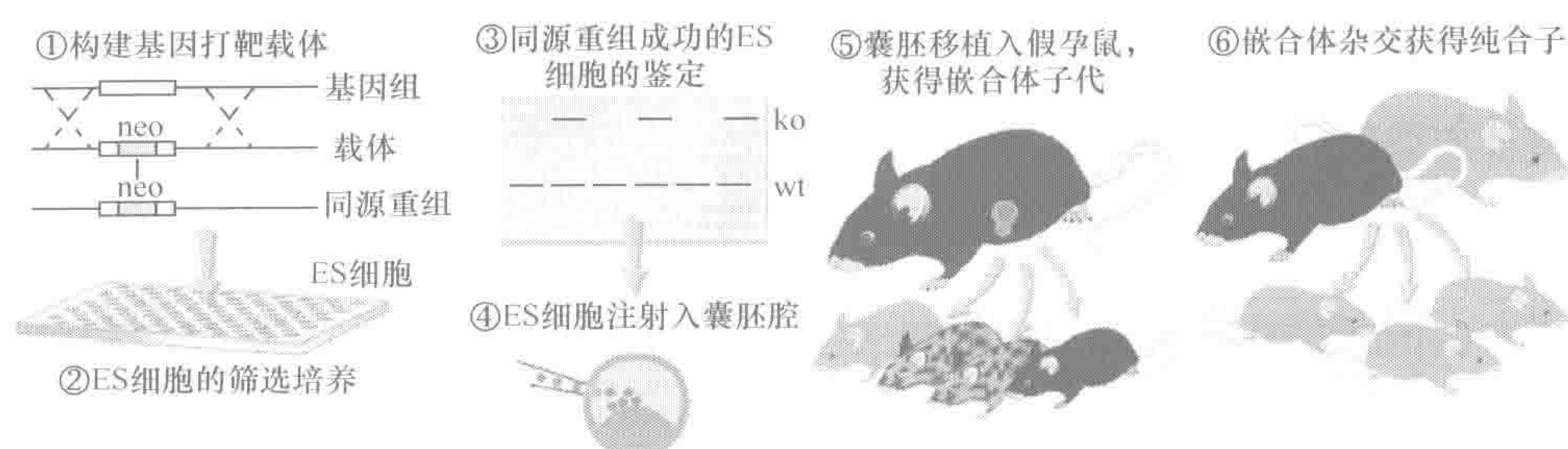


图 35-1　利用基因同源重组进行基因敲除的基本过程

（一）基因敲除载体的构建

构建特定基因的敲除载体必须深入了解该基因的结构组成，如该基因在染色体上的定位、组成该基因的核苷酸序列、外显子和内含子数目以及特定位点的限制性内切核酸酶的种类等。基因打靶载体包括载体骨架、靶基因同源序列和突变序列及选择性标记基因等非同源序列。基因打靶载体有基因插入型载体和基因置换型载体。插入型载体中与靶基因同源的区段中含有特异的酶切位点，线性化后，同源重组导致基因组序列的重复，从而干扰了目标基因的功能。大多数基因敲除突变都采用置换型载体。它是在质粒中两条同源臂对应的内源基因之间插入完整的正向选择基因。置换型载体进行线性化的酶切位点在引导序列和筛选基因外侧，线性化后，同源重组使内源靶基因的部分序列已被选择基因替代，而选择基因的插入使内源性基因的功能丧失。另外，经过置换的内源性基因已不具备野生型基因的完整结构，也就无法回复突变。基因敲除载体主要在以下3方面影响同源重组的效率：①同源基因 DNA 序列的应用：已知同源重组的效率非常低（10^{-7}～10^{-3}），应用同源基因 DNA 片段构建载体，可以有效地提高重组效率近 20 倍，所以普遍采用来自 ES 细胞相同品系小鼠的基因片段作为同源片段，以避免不同品系基因组中存在的遗传异质性。普遍的做法是从所选取的 ES 细胞获得的基因组 DNA 构建文库，从中筛选目的基因构建载体；②同源臂的长度：随着同源臂长度的增加，重组频率也增加。在置换型载体中，每条同源臂的同源序列的长度一般为 3kb 左右。除了每条同源臂的长度外，两条臂的总长度对重组也有很大影响，一般总长度在6～10kb；③载体需线性化：线性化载体比环化载体重组效率高 10～1000 倍。

（二）ES 细胞的体外培养和基因敲除载体的导入

基因敲除所使用的受体细胞一般用 ES 细胞。ES 细胞是一种多潜能的干细胞，可以参与包括生殖腺在内的各种组织嵌合体的形成。目前常用的是鼠胚胎干细胞，而兔、猪、鸡等的胚胎干细胞也有使用。小鼠胚胎干细胞是从着床前胚胎的（孕 3～5d）内细胞团（inner mass）分离的细胞。最早于 1981 年由 Martin 等分离培养成功。常用的小鼠品系是 129 及其杂合体。而其他遗传背景的胚胎干细胞系也逐渐被发展应用。

外源基因导入 ES 细胞的方法有显微注射法、电穿孔法、逆转录病毒载体法、脂质体包装法以及磷酸钙沉淀法等。最常用的效率较高的方法主要是显微注射法和电穿孔

法。采用显微注射的方法，在经抗生素筛选出的克隆中，发生同源重组的概率为1/150；而采用电转化的方法时，在经抗生素筛选出的克隆中，发生同源重组的概率仅为1/300。但显微注射的技术难度较电穿孔法大。

（三）筛选鉴定重组成功的 ES 细胞

由于基因转移的同源重组自然发生率极低，且随机整合的频率远大于同源重组。因此如何从众多细胞中筛选出真正发生了同源重组的胚胎干细胞非常关键。目前常用的方法是正负双向筛选法（positive-negative-selection，PNS）、正相选择法、PCR 法以及 Southern 印迹法。其中应用最多的是 PNS 法。

1. 正负双向选择法

为了更好地筛选发生同源重组的克隆，1988 年 Mansour 等设计了 PNS，解决了定点整合与随机整合的鉴别问题。同源重组时，只有载体的同源区以内部分发生重组，同源区以外部分将被切除。随机整合时，是在载体的两端将整个载体连入染色体内。置换型载体含有正负选择基因各一，正选择基因多为 *neo*（neomycin）基因，位于同源区内，其在随机整合和同源重组时均可正常表达。正向筛选标记基因 *neo* 具有双重作用，一方面导致靶基因的插入突变；另一方面作为重组细胞的正向筛选标志，该基因产物可使细胞在含有新霉素（G418）的培养基中生长。负选择基因位于载体两同源臂的外侧，常用单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶（HSV-tk）基因。在同源重组时，*tk* 基因将被切除而丢失，相反在随机整合时，所有的选择基因均保留（包括 *neo* 和 *tk*）。胸苷激酶蛋白（TK）可使无毒的丙氧鸟苷（ganciclovir，GANC）转变为毒性核苷酸，从而杀死细胞，因而可用丙氧鸟苷筛选排除随机整合的细胞株。故同源重组时，G418 和 GANC 都有抗性；而随机整合时虽对 G418 有抗性，但对 GANC 敏感，细胞将被杀死，无整合的细胞将被 G418 杀死。因此用 G418 作正筛选，选出含有 *neo* 基因的细胞株，再用丙氧鸟苷作负向筛选淘汰含有 *tk* 基因的细胞株，保留未含有 *tk* 基因的同源重组细胞株。此方法是目前应用较广泛的一种策略，能使筛选重组 ES 细胞克隆的效率提高 20～200 倍。除了上述方法外，还可用 PCR 及 Southern 印迹法进一步筛选及鉴定同源重组成功的 ES 细胞。

2. 正相选择法

这种选择法适用于在靶细胞内正常表达的基因的定点突变。其主要程序是：将选择标记基因 *neo* 的启动子和起始密码剪切掉，再嵌合入打靶载体中与靶位点同源的序列内，将打靶载体转染进靶细胞，可能出现下面几种情况。

1）打靶载体不整合入靶细胞基因组，将随传代而丢失。

2）外源打靶序列随机整合，由于 *neo* 基因缺失了其自身的启动子和起始密码，整合位点周围亦无启动子，使 *neo* 基因的表达受阻。

3）虽然是随机整合，但其整合位点侧翼序列在其他基因的启动子作用下能启动 *neo* 基因的表达。

4）外源打靶载体与靶位点发生了同源重组，则 *neo* 基因可借助靶基因自然存在的启动子和起始密码的作用而呈现表达活性。

因此，如果用 G418 筛选，则抗性细胞中将只包含后两种可能情况，根据这两种情况下基因组 DNA 酶切图谱的不一致，用 Southern 印迹即可检测出同源重组的克隆。

3. PCR 扩增

采用在经过改造的载体中插入的一小段寡聚核苷酸（约 29bp）序列，该序列正好与基因组基因上的一小段序列组成一对 PCR 引物，这样通过 PCR 扩增产物的大小即可区分同源重组和随机插入。

4. Southern 印迹

用特定的限制性内切核酸酶消化从干细胞中提取的经过扩增的基因组 DNA，以敲除载体为探针，对于发生了同源重组的干细胞克隆和随机整合了敲除载体的干细胞克隆，其杂交出的条带大小和种类有差异。

（四）ES 细胞注射入囊胚

用来制备 ES 细胞嵌合体的方法主要是囊胚腔注射法，此法操作相对简便、成功率也较高。如果 ES 细胞供体为棕褐色 129 小鼠，为了能够根据毛色的嵌合程度来评估 ES 细胞的整合程度，供体囊胚必须来源于白色、黑色或非棕褐色的品系，最常用的胚胎供体小鼠品系是 C57BL/6J 和 BALB/c。

（五）囊胚移植入受体鼠

将含 ES 细胞的囊胚移植入受体小鼠的过程，对受体鼠的选择比较严格。需要应用与囊胚供体毛色不同的小鼠品系做受体鼠，以便在小鼠出生时能准确地判断该小鼠是否来自于供体胚胎。一般选择 8 周龄以上的处于自然发情期的雌鼠作为受体鼠。早期囊胚可移植到输卵管中，最终种植在子宫中。也可以直接移植在子宫中。

（六）嵌合体杂交育种

当胚泡和 ES 细胞分别来自两种不同品系或毛色不同的小鼠时，嵌合型小鼠呈“花鼠”状，很容易通过毛色识别，即该小鼠的组织细胞有两个来源：一个是宿主囊胚，另一个是注射的 ES 细胞。由于 ES 细胞可以发育成部分嵌合型小鼠的生殖细胞，这部分小鼠（通常用雄鼠）和胚泡供体相同品系的小鼠（常为雌鼠）交配后即可获得杂合型小鼠，进而自配可获纯合型小鼠。

二、条件性基因敲除

（一）Cre-loxP 系统

Hoess 等在埃希氏大肠杆菌噬菌体 P1 中发现了 Cre-loxP 系统，Cre（causes recombination）基因表达产物是位点特异性重组发生所需的特异性重组酶，其识别位点为 loxP（locus of crossingover，交换基因座），为一段 34bp 的 DNA 序列，由两个 13bp 的反向重复序列和一个 8bp 的不对称间隔序列（核心序列）组成，5′-ATAACTTCG-TATAATGTATGCTATACGAAGTTAT-3′。loxP 位点碱基重排后形成十字形的结构，核心序列形成一单链环，它是 Cre 重组酶识别、切割和发生 DNA 重组的位点。其

中，对称的 13bp 反向重复序列是 Cre 重组酶结合的位点。由于 loxP 具有一个对称间隔序列，这使特异性位点有了方向性，根据两个特异性位点的方向，重组酶可使特异性位点间的 DNA 发生下列 3 种结果（图 35-2）。

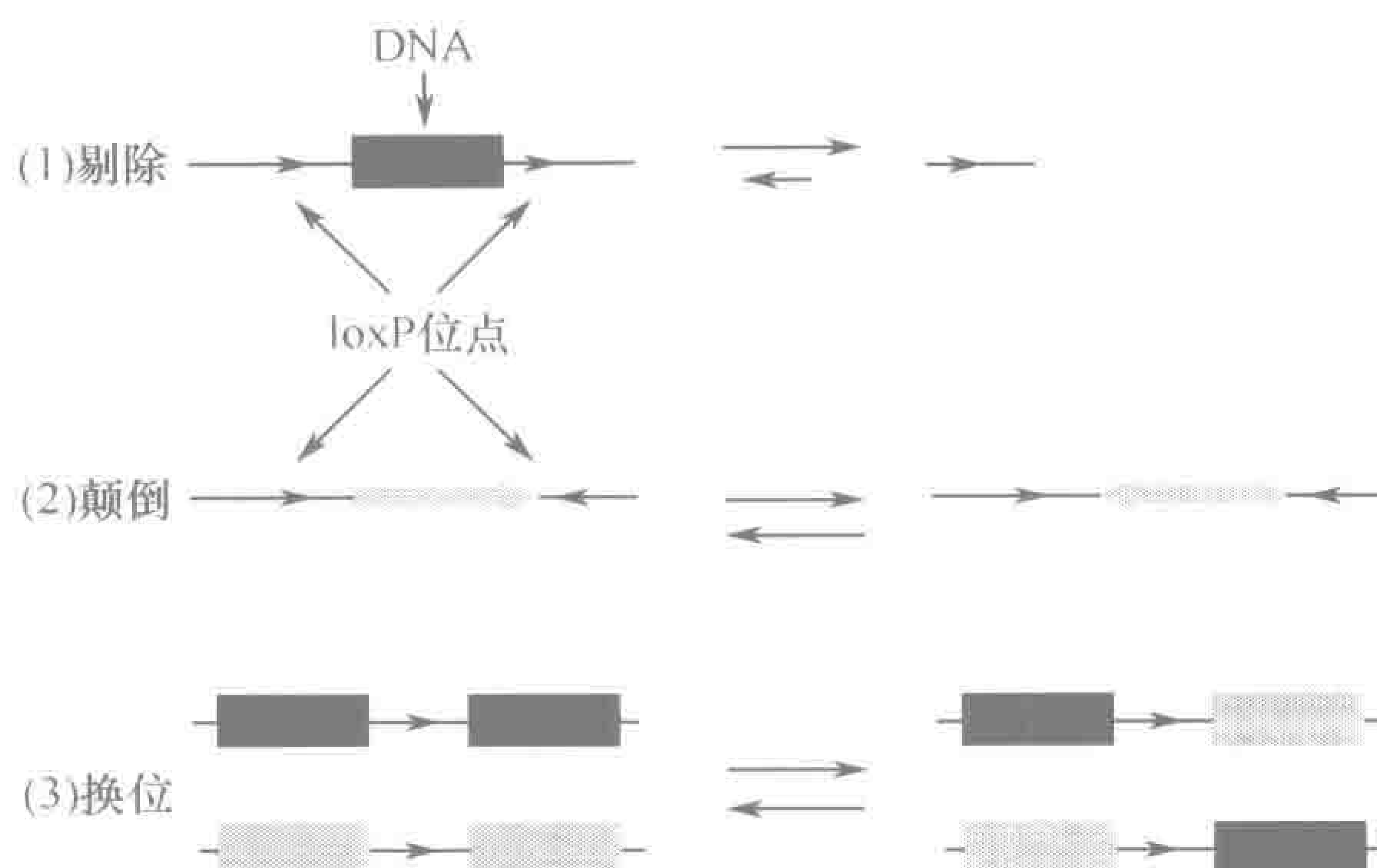


图 35-2　Cre 酶作用结果示意图

1）剔除：同一条 DNA 分子上有两个 loxP 位点，如果顺序相同，则可能出现 loxP 位点间基因剔除，仅留下一个 loxP 位点。
2）颠倒：同一条 DNA 分子上有两个 loxP 位点，如果顺序相反，则可能出现 loxP 位点间基因方向颠倒。
3）换位：如果基因组不同 DNA 分子上各有一个 loxP 位点，可能出现 loxP 前后基因片段交叉换位。

（二）Flp-FRT 系统

该系统与 Cre-loxP 系统类似，也是由一个重组酶和一段特殊的 DNA 序列组成。其中，重组酶 Flp 是酵母细胞内的一个由 423 个氨基酸组成的单体蛋白。与 Cre 相似，Flp 发挥作用也不需要任何辅助因子，同时在不同的条件下具有良好的稳定性。该系统的另一个成员是 Flp 识别位点（Flp recognition target，FRT），它与 loxP 位点非常相似，同样由两个长度为 13bp 的反向重复序列和一个长度为 8bp 的核心序列构成。在该系统发挥作用时，FRT 位点的方向决定了目的片段的缺失还是倒转。这两个系统比较明显的区别是它们发挥作用的最佳温度不同，Cre 重组酶发挥作用的最佳温度为 37℃，而 Flp 重组酶为 30℃。因此，Cre-loxP 系统最适宜在动物体内使用。

（三）条件性基因敲除

完全基因敲除，也就是通过同源重组直接将靶基因在细胞或者是动物个体内的活性完全消除。但是完全基因敲除使小鼠所有细胞基因组上都存在基因的缺失或突变，有些重要的靶基因敲除会导致动物胚胎的早期死亡或严重的发育缺陷，使得突变无法传代，不利于在小鼠各个发育阶段进行该基因功能的分析。为了克服这一弊端，必须要找到一种可以人为控制基因在特定发育阶段表达或敲除的方法。1993 年，Gu 等应用 Cre-loxP 重组酶系统实现了外源基因的时间特异性表达。在此基础上，条件基因敲除技术得以形成。

条件性基因敲除（conditional gene targeting）可定义为将某个基因的敲除限制于小鼠某些特定类型的组织细胞或发育的某一特定阶段的一种特殊的基因敲除方法。它实际上是在常规的完全基因敲除的基础上，利用重组酶介导的位点特异性重组技术，在对小鼠基因改造的时空范围上设置一个可调控的“按钮”，从而使对小鼠基因组改造的范围和时间处于一种可控状态。利用 Cre-loxP 和来自酵母的 Flp-FRT 系统可以研究特定组织器官或特定细胞中靶基因灭活所导致的表型。目前，在建立条件性基因敲除小鼠时使用最多的是 Cre-loxP 系统。

通过常规基因打靶在基因组的靶位点上装上两个同向排列的 loxP（loxP floxed），并将此基因载体打靶入 ES 细胞，产生“loxP floxed”小鼠，虽然其靶基因的两侧已各插入了一个 loxP，但靶基因并没有发生其他的变化，故“loxP floxed”小鼠表型仍同野生型的一样。然后，通过将“loxP floxed”小鼠与某些组织细胞特异的表达 Cre 酶的转基因鼠杂交（也可以其他方式向小鼠中引入 Cre 重组酶），产生的子代中将同时带有“loxP floxed”靶基因和 Cre 基因。Cre 基因表达产生的 Cre 重组酶就会介导靶基因两侧的 loxP 间发生切除反应，结果将一个 loxP 和靶基因切除，得到在特定的组织细胞中靶基因被敲除的条件性敲除小鼠。靶基因的敲除是以 Cre 的表达为前提的。Cre 酶表达特性决定了靶基因的敲除特性，即 Cre 酶在哪一种组织细胞中表达，靶基因的敲除就发生在哪种组织细胞；而 Cre 酶的表达水平将影响靶基因在此种组织细胞中进行敲除的效率。因此，只要控制 Cre 酶的表达特异性和表达水平就可实现对小鼠中靶基因敲除的特异性和程度。

三、诱导性基因敲除

诱导性基因敲除就是以 Cre-loxp 系统为基础、利用控制 Cre 表达的启动子的活性或所表达的 Cre 酶活性具有可诱导的特点，通过对诱导剂给予时间的控制或利用 Cre 基因定位表达系统中载体的宿主细胞特异性和将该表达系统转移到动物体内的过程在时间上的可控性、从而在“loxP floxed”小鼠的一定发育阶段和一定组织细胞中实现对特定基因进行遗传修饰之目的的基因敲除技术。人们可以通过对诱导剂给予时间的预先设计的方式来对动物基因突变的时空特异性进行人为控制，以避免出现死胎或动物出生后不久即死亡的现象。其优点有：①诱导基因突变的时间可人为控制；②可避免因基因突变而致死胎的问题；③如用病毒等基因转移系统来介导 Cre 的表达，则可省去建立携带 Cre 的转基因动物的过程。如果采用组织细胞特异的启动子来控制 Cre 的表达，其诱导的基因敲除的组织细胞特异性还可进一步提高。常见的几种诱导性打靶类型有四环素诱导型、干扰素诱导型、激素诱导型、腺病毒介导型。

四环素诱导系统是目前研究最多的诱导表达系统。该系统含有 3 个基本的要素：tTA（tetracycline transactivator）或 rtTA（reverse tetracycline transactivator）、Ptet、四环素或多西环素。其中 tTA 或 rtTA 作为一种转录因子是一个融合蛋白，具有两部分：一部分来源于原核生物体内的四环素阻碍蛋白（Tet repressor，Tet R）；另一部分来源于真核生物体内，是真核细胞内转录因子的转录激活结构域，应用最为广泛的是单纯疱疹病毒编码的 VP16 的酸性结构域。这两部分构成的融合蛋白（tTA 或 rtTA）可以受四环素或其衍生物的调节而发生构象变化，从而改变与相应的 DNA 序列［四环素

抗性元件（Tet resistance operon，TetO）］的结合能力。tTA 或 rtTA 的另一个功能就是转录激活功能，当其在真核细胞内与相应的 DNA 反应元件结合后可以启动下游基因的转录。rtTA 与 tTA 相比有几个氨基酸位置的突变，突变的结果是两者对四环素反应后产生的效应完全相反。rtTA 只有在四环素存在的情况下才能与反应元件 TetO 相结合，而 tTA 只有在四环素不存在的情况下才能与 TetO 结合。在具体的应用中，tTA 或 rtTA 被置于特定启动子的调控之下，以实现其在特定的组织器官中进行表达。Ptet 是一个受 tTA 或 rtTA 调控的启动子，含有一个 RNA 聚合酶Ⅱ启动子的最小功能单位和若干个 TetO 序列，该启动子只有与 tTA 或 rtTA 结合时才能激活下游基因的表达。因此，在应用过程中 Ptet 被用来调控 Cre 重组酶的产生。

四环素诱导系统包含两个互补系统，分别为 tTA 依赖和 rtTA 依赖的基因敲除系统，现在又被称为 Tet-Off（tTA 依赖）系统和 Tet-On（rtTA 依赖）系统。在这两个系统中，四环素控制转录因子 tTA 或 rtTA 与启动子 Ptet 的结合，从而调节下游基因的表达。所不同的是 tTA 与启动子 Ptet 的结合是不需要四环素的，四环素阻碍两者之间的相互作用；而 rtTA 与启动子 Ptet 的相互结合只有在四环素或其衍生物多西环素（强力霉素）存在的情况下才会发生，没有四环素或多西环素时两者不发生相互作用。因此这两个系统以相反的方式对四环素进行反应，成为两个互补系统。

四环素或多西环素作为 Tet-On 和 Tet-Off 系统的效应剂，与 tTA 或 rtTA 相互作用从而调节它们与 Ptet 的亲和力。多西环素是四环素的衍生物，由于其具有毒性小、所用剂量小等优点，在实际应用中更为广泛。采用该系统进行条件性基因敲除时，要将受特异性启动子调控的 tTA 的表达载体转入小鼠体内，同时还要将受 Ptet 启动子调控的 Cre 重组酶的表达载体也转入小鼠体内。这样一个转基因小鼠与 loxP 的转基因小鼠进行交配，产生的子代小鼠中会在特定组织和器官中表达 tTA，tTA 再与 Ptet 结合后激活下游的 Cre 重组酶的表达，实现特定基因在特定组织器官中的敲除。如果在子代小鼠出生时就给予四环素，并且一直维持下去，特定基因的敲除就不会发生，只有在停止四环素的应用后才会发生该基因在特定部位的丢失。采用 rtTA 系统与上述情况正好相反，在不用四环素时基因敲除不发生，只有给予四环素时才会导致特定基因在特定部位的敲除。因此，该系统可以对靶位点的剔除或修饰进行时间和空间的二维调控。

四、基因捕获法

用常规方法进行基因打靶研究需耗费大量的时间和人力，研究者必须针对靶位点在染色体组文库中筛选相关的染色体组克隆，绘制相应的物理图谱，构建特异性的打靶载体以及筛选中靶 ES 细胞等，通常获得一个基因敲除的纯合子小鼠需要一年或更长的时间。面对人类基因组计划产生出来的巨大的功能未知的遗传信息，传统的基因敲除方法显得有些力不从心。因此，基因捕获法应运而生。利用基因捕获可以建立一个携带随机插入突变的 ES 细胞库，节省大量筛选染色体组文库以及构建特异打靶载体的工作及费用，更有效、更迅速地进行小鼠基因组的功能分析。典型的基因捕获载体包括一个无启动子的标记基因，通常是 *neo* 基因。*neo* 基因插入到 ES 细胞染色体组中，并利用所捕获基因的转录调控元件实现 *neo* 基因表达的 ES 克隆可以很容易地在含 G418 的选择培

养基中筛选出来。从理论上讲，在选择培养基中存活的克隆应该 100% 含有中靶基因。中靶基因的信息可以通过筛选标记基因侧翼 cDNA 或染色体组序列分析来获得。

用基因捕获法在单次实验中可以获得数以百计的带有单基因剔除的 ES 克隆。这些克隆可以在 96 孔培养板中培养并用于基因型分析。此方法的缺点是只能剔除在 ES 细胞中表达的基因。现在的基因捕获载体从理论上来讲应能剔除所有在 ES 细胞表达的基因，因此，在 ES 细胞中进行基因捕获还是具有很大潜力的。基因捕获法进行基因剔除的另一个缺点是无法对基因进行精细的遗传修饰。

五、转座子系统

转座子（transposon）是在多种生物（包括玉米、蠕虫、昆虫、人类等）中可被识别的可以移动的基因单位。它的结构主要包括双侧末端重复序列及中间的抗性基因、转座酶读码框等。转座子系统自从 20 世纪 50 年代被 McClintock 发现以来，已经成为对许多组织进行基因分析的工具。在人和小鼠的基因组中，转座子衍生序列多达整个基因组的 40%，这提示在发育过程中转座子有着重要作用。

夸娥转座子（piggyBac，PB 转座子）的发现成功地解决了 DNA 片段的携带限制这一问题。PB 转座子有 2472bp，有 13bp 的反向末端重复序列和一个 594 个氨基酸的转座酶。PB 转座子插入四核苷酸 TTAA 位点。PB 转座子能有效地在非同源染色体上发生重组且几乎唯一地发生在 TTAA 位点。PB 转座子能整合进入小鼠基因组且无明显的染色体区域性选择。而且 PB 转座子单元能携带复杂的标志基因，并准许这些基因在不同的插入位点表达。PB 转座子已成为有力的基因插入工具，它在基因插入时很少引起基因组破坏。对于插入突变基因的 PB 转座子也能携带报道基因来提高/促进基因删除或基因捕获，这能极大地促进小鼠功能基因组的研究。

六、Hit 和 Run 法

许多人类疾病是由于基因点突变引起的功能异常，如人类镰状红细胞贫血就是由于编码血红蛋白 β 链第 6 位谷氨酸（GAG）被缬氨酸（GUG）取代所引起的。但这种基因病无法用整个基因敲除的方法获得相应的疾病模型。因此研究者将精细突变引入到基因研究工作中来。Hit 和 Run 法也称进退策略。它包括两次同源重组：第一步（Hit）用插入型载体进行同源重组，在靶位点插入带有突变的基因组序列以及带有两个筛选标记（如 *neo* 和 *tk*）的载体序列；第二步（Run）利用 *tk* 抗性筛选，富集发生去除了含有负筛选标记基因的载体序列的回复突变的克隆。Hit 和 Run 法的不足之处是：①无法精确控制染色体内的同源重组，可能会失去携带突变的同源序列，而保留未修饰的内源片段；②整个过程需要采用两种培养基分别进行先后两次筛选；③无法同时引进多个位点突变。

七、双置换法

双置换法（double replacement）属于精细突变敲除。它首先用含有 Hprt（hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase）基因的打靶载体转染 $Hprt^-$ ES 细胞，通过在次黄嘌呤、氨喋呤和脱氧胸腺嘧啶苷（hypoxanthine、aminopterin and thymidine,

HAT）培养基中筛选并用 PCR 进行基因组分析，筛选发生同源重组、Hprt 基因阳性的克隆。然后用只携带突变同源序列的打靶载体转染上一步获得的 $Hprt^+$ ES 细胞。同源重组发生后，突变序列将 Hprt 置换出来。$Hprt^-$ 细胞可在 6-巯基鸟嘌呤（6-thioguanine，6-TG）培养基上筛选并用 PCR 进行分析。这种方法的优点在于，第一步获得的 $Hprt^+$ ES 细胞，除了可用于产生普通的基因剔除小鼠外，也可以作为将不同突变引入靶基因的基础。

第三节　结　　语

基因敲除技术在 20 世纪 80 年代发展起来后已经应用到许多领域，尤其在生命科学研究领域发挥着不可替代的作用，使研究者能在整体水平、细胞水平和分子水平上多层次的研究各种基因的功能，建立人类疾病的转基因动物模型。这些疾病模型的建立使研究者可以在动物体内进行疾病发病机制的研究，同时研究和探索治疗人类遗传性疾病的途径。在免疫学研究领域，基因敲除技术发挥着它巨大的作用，利用基因敲除小鼠研究免疫分子或免疫细胞的功能，可以获得更接近于机体内真实情况的研究结果；应用自身免疫性疾病的基因敲除小鼠模型，为深入研究自身免疫病的病因、发病机制创造了有利的条件。

（刘星光）

参考文献

蒋思文. 2009. 动物生物技术. 北京：科学出版社.

万海英，汤华. 2007. 基因敲除技术现状及应用. 医学分子生物学杂志，4（1）：86～90.

Capecchi MR. 1989. The new mouse genetics：altering the genome by gene targeting. Trends Genet，5（3）：70～76.

Cid-Arregui A，Garcila-Carranca A. 1997. Microinjection and Transgenesis：Strategies and Protocols. Berlin：Springer-Verlag，521～560.

Ding S，Wu X，Li G，et al. 2005. Efficient transposition of the piggyBac（PB）transposon in mammalian cells and mice. Cell，122（3）：473～483.

Gu H，Marth JD，Orban PC，et al. 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. Science，265（5168）：103～106.

Gu H，Zou YR，Rajewskey K. 1993. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-Mediated gene targetting. Cell，73（6）：1155～1164.

Hoess R，Abremski K，Sternberg N. 1984. The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. Cold Spring Harb Symp Quant Biol，49：761～768.

Hogan B，Beddington R，Costantini F，et al. 1994. Manipulating the mouse embryo：a laboratory manual. New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press，117～119.

Jaenisch R，Mintz B. 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocytes injected with viral DNA. Proc Natl Acad Sci USA，71（4）：1250～1254.

Mansour SL，Thomas KR，Capecchi MR. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells：a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. Nature，336（6197）：348～352.

Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by tera-

tocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA，78（12）：7634～7638.

Okamoto M，Murakami M，Shimizu A，et al. 1992. A transgenic model of autoimmune hemolytic anemia. J Exp Med，175：71～79.

Palmiter RD，Brinster RL，Hammer RE，et al. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with a metallothionein-growth hormone fusion gene. Nature，300（5893）：611～615.

Sauer B，Henderson N. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci USA，85（14）：5166～5170.

Thomas KR，Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell，51（3）：503～512.

附　　录

附录A　常用缓冲液与试剂

一、常用酸碱

表 A.1.1　常用酸碱的一般性质

名称	分子式	相对分子质量	重量比例/%	摩尔浓度	配制 1mol/L 溶液的量/(ml/L)	相对密度
酸						
冰乙酸	CH_3COOH	60.05	99.6	17.4	57.5	1.05
蚁酸	$HCOOH$	46.03	90	23.6	42.4	1.205
			98	25.9	38.5	1.22
盐酸	HCl	36.46	36	11.6	85.9	1.18
硝酸	HNO_3	63.01	70	15.7	63.7	1.42
高氯酸	$HClO_4$	100.46	60	9.2	108.8	1.54
			72	12.2	82.1	1.70
硫酸	H_2SO_4	98.07	98	18.3	54.5	1.835
磷酸	H_3PO_4	98.00	85	14.7	67.8	1.70
碱						
氢氧化钾	KOH	56.11	45	11.6	82.2	1.447
			50	13.4	74.6	1.51
氢氧化铵	NH_4OH	35.0	28	14.8	67.6	0.90
氢氧化钠	$NaOH$	40.0	50	19.1	52.4	1.53

二、常用缓冲液

1. Tris-盐酸缓冲液（0.05mol/L，25℃）

三羟甲基氨基甲烷（Tris）的相对分子质量为 121.14，Tris-盐酸缓冲溶液的 pH 为 7.10～8.90。0.1mol/L 溶液为 12.114g/L。

取 50ml 0.1mol/L 三羟甲基氨基甲烷（Tris）溶液与 Xml 0.1mol/L 盐酸混匀后，加水稀释至 100ml。Tris 溶液可从空气中吸收 CO_2，使用时注意瓶盖密闭。

表 A.2.1　Tris-盐酸缓冲液(0.05mol/L,25℃)

pH	X/ml	pH	X/ml
7.10	45.70	8.10	26.20
7.20	44.70	8.20	22.90
7.30	43.40	8.30	19.90
7.40	42.00	8.40	17.20
7.50	40.30	8.50	14.70
7.60	38.50	8.60	12.40
7.70	36.60	8.70	10.30
7.80	34.50	8.80	8.50
7.90	32.00	8.90	7.00
8.00	29.20		

2. 磷酸盐缓冲溶液

(1) 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液（PB，0.2mol/L）

表 A.2.2.1　磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液(PB,0.2mol/L)

pH	0.2mol/L NaH_2PO_4/ml	0.2mol/L Na_2HPO_4/ml	pH	0.2mol/L NaH_2PO_4/ml	0.2mol/L Na_2HPO_4/ml
5.80	8.00	92.00	7.00	61.00	39.00
5.90	10.00	90.00	7.10	67.00	33.00
6.00	12.30	87.70	7.20	72.00	28.00
6.10	15.00	85.00	7.30	77.00	23.00
6.20	18.50	81.50	7.40	81.00	19.00
6.30	22.50	77.50	7.50	84.00	16.00
6.40	26.50	73.50	7.60	87.00	13.00
6.50	31.50	68.50	7.70	89.50	10.50
6.60	37.50	62.50	7.80	91.50	8.50
6.70	43.50	56.50	7.90	93.00	7.00
6.80	49.50	51.00	8.00	94.70	5.30
6.90	55.00	45.00			

注：$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 相对分子质量 = 156.01，0.2mol/L 溶液为 78.05g/L。$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 相对分子质量 = 358.14，0.2mol/L 溶液为 71.63g/L。

(2) 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液（1/15mol/L）

表 A.2.2.2　磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液(1/15mol/L)

pH	1/15mol/L Na_2HPO_4/ml	1/15mol/L KH_2PO_4/ml	pH	1/15mol/L Na_2HPO_4/ml	1/15mol/L KH_2PO_4/ml
4.92	0.10	9.90	7.17	7.00	3.00
5.29	0.50	9.50	7.38	8.00	2.00
5.91	1.00	9.00	7.73	9.00	1.00
6.24	2.00	8.00	8.04	9.50	0.50
6.47	3.00	7.00	8.34	9.75	0.25
6.64	4.00	6.00	8.67	9.90	0.10
6.81	5.00	5.00	8.18	10.00	0.00
6.98	6.00	4.00			

注：$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 相对分子质量 = 358.14，1/15mol/L 溶液为 23.88g/L。KH_2PO_4 相对分子质量 = 136.09，1/15mol/L 溶液为 9.08g/L。

(3) PBS

NaCl（137mmol/L）	8.00g
KCl（2.7mmol/L）	0.20g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$（4.3mmol/L）	1.54g
KH_2PO_4（1.4mmol/L）	0.20g

在 1000ml 双蒸水中逐项溶解，调节 pH 为 7.20。

3. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（0.1mol/L）

表 A.2.3 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1mol/L)

pH	0.1mol/L 柠檬酸/ml	0.1mol/L 柠檬酸钠/ml	pH	0.1mol/L 柠檬酸/ml	0.1mol/L 柠檬酸钠/ml
3.00	18.60	1.40	5.00	8.20	11.80
3.20	17.20	2.80	5.20	7.30	12.70
3.40	16.00	4.00	5.40	6.40	13.60
3.60	14.90	5.10	5.60	5.50	14.50
3.80	14.00	6.00	5.80	4.70	15.30
4.00	13.10	6.90	6.00	3.80	16.20
4.20	12.30	7.70	6.20	2.80	17.20
4.40	11.40	8.60	6.40	2.00	18.00
4.60	10.30	9.70	6.60	1.40	18.60
4.80	9.20	10.80			

注：柠檬酸 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 相对分子质量＝210.14，0.1mol/L 溶液为 21.01g/L。柠檬酸钠 $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 相对分子质量＝294.12，0.1mol/L 溶液为 29.41g/L。

4. 乙酸-乙酸钠缓冲液（0.2mol/L，18℃）

表 A.2.4 乙酸-乙酸钠缓冲液(0.2mol/L，18℃)

pH	0.2mol/L NaAc/ml	0.2mol/L HAc/ml	pH	0.2mol/L NaAc/ml	0.2mol/L HAc/ml
2.60	0.75	9.25	4.80	5.90	4.10
3.80	1.20	8.80	5.00	7.00	3.00
4.00	1.80	8.20	5.20	7.90	2.10
4.20	2.65	7.35	5.40	8.60	1.40
4.40	3.70	6.30	5.60	9.10	0.90
4.60	4.90	5.10	5.80	9.40	0.60

注：NaAc 相对分子质量＝82.03，0.2mol/L 溶液为 16.41g/L。

5. 甘氨酸-盐酸缓冲液（0.05mol/L）

表 A.2.5 甘氨酸-盐酸缓冲液(0.05mol/L)

pH	X	Y	pH	X	Y
2.00	50.00	44.00	3.00	50.00	11.40
2.40	50.00	32.40	3.20	50.00	8.20
2.60	50.00	24.20	3.40	50.00	6.40
2.80	50.00	16.80	3.60	50.00	5.00

注：Xml 0.2mol/L 甘氨酸＋Yml 0.2mol/L HCl，再加双蒸水稀释至 200ml。甘氨酸相对分子质量＝75.07，0.2mol/L 甘氨酸溶液为 15.01g/L。

6. 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

表 A.2.6　磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

pH	0.2mol/L Na_2HPO_4/ml	0.1mol/L 柠檬酸/ml	pH	0.2mol/L Na_2HPO_4/ml	0.1mol/L 柠檬酸/ml
2.20	0.40	10.60	5.20	10.72	9.28
2.40	1.24	18.76	5.40	11.15	8.85
2.60	2.18	17.82	5.60	11.60	8.40
2.80	3.17	16.83	5.80	12.09	7.91
3.00	4.11	15.89	6.00	12.63	7.37
3.20	4.94	15.06	6.20	13.22	6.78
3.40	5.70	14.30	6.40	13.85	6.15
3.60	6.44	13.56	6.60	14.55	5.45
3.80	7.10	12.90	6.80	15.45	4.55
4.00	7.71	12.29	7.00	16.47	3.53
4.20	8.28	11.72	7.20	17.39	2.61
4.40	8.82	11.18	7.40	18.17	1.83
4.60	9.35	10.65	7.60	18.73	1.27
4.80	9.86	10.14	7.80	19.15	0.85
5.00	10.30	9.70	8.00	19.45	0.55

注：$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 相对分子质量＝358.14，0.2mol/L 溶液为 71.63g/L。$C_4H_2O_7 \cdot H_2O$ 相对分子质量＝210.14，0.1mol/L 溶液为 21.01g/L。

7. 柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液

表 A.2.7　柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液

pH	钠离子浓度/(mol/L)	柠檬酸/g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	氢氧化钠/g	浓盐酸/ml	最终体积/L
2.20	0.20	210	84	160	10
3.10	0.20	210	83	116	10
3.30	0.20	210	83	106	10
4.30	0.20	210	83	45	10
5.30	0.35	245	144	68	10
5.80	0.45	285	186	105	10
6.50	0.38	266	156	126	10

8. 巴比妥钠-盐酸缓冲液（18℃）

表 A.2.8　巴比妥钠-盐酸缓冲液(18℃)

pH	0.04mol/L 巴比妥钠溶液/ml	0.2mol/L 盐酸/ml	pH	0.04mol/L 巴比妥钠溶液/ml	0.2mol/L 盐酸/ml
6.80	100	18.4	8.40	100	5.21
7.00	100	17.8	8.60	100	3.82
7.20	100	16.7	8.80	100	2.52
7.40	100	15.3	9.00	100	1.65
7.60	100	13.4	9.20	100	1.13
7.80	100	11.47	9.40	100	0.70
8.00	100	9.39	9.60	100	0.35
8.20	100	7.21			

注：巴比妥钠相对分子质量＝206.18，0.04mol/L 溶液为 8.25g/L。

三、ELISA 相关试剂

(1) 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液，pH9.6

A 液（0.2mol/L $NaCO_3$）：取 $NaCO_3$ 10.6g 溶于 500ml 双蒸水。

B 液（0.2mol/L $NaHCO_3$）：取 $NaHCO_3$ 16.8g 溶于 1000ml 双蒸水。

临用时取 A 液 160ml、B 液 340ml，混匀，加入双蒸水至 2000ml。

(2) 清洗液（PBS-Tween 溶液，pH7.4）

NaCl	8.0g
KH_2PO_4	0.2g
$Na_2PO_4 \cdot 12H_2O$	2.9g
KCl	0.2g
Tween 20	0.5ml

加入双蒸水至 1000ml。

(3) ELISA 碱性磷酸酶（AKP）底物

选择适宜的缓冲液用于实验。用前 3h 配制，避光保存。

0.1mol/L 盐酸乙醇胺，pH9.8。85ml 水中溶解 1g 盐酸乙醇胺。浓盐酸调 pH 至 9.0。再加入 50μl 1mol/L $MgCl_2$。于室温保存 1 周或 4℃保存 1 个月。

0.1mol/L Na_2CO_3/0.5mmol/L $MgCl_2$。100ml 水中溶解 1.1g Na_2CO_3。加入 50μl 1mol/L $MgCl_2$。密闭保存，于室温保存 1 周或 4℃保存 1 个月。

临用前，取 10ml 缓冲液中溶解 10mg 氮苯磷酸盐，使其终浓度达到 1mg/ml。

(4) ELISA 辣根过氧化物酶底物 OPD

A 液（0.1mol/L 磷酸氢二钠）：

$Na_2PO_4 \cdot 12H_2O$	1.42g
双蒸水	100ml

B 液（0.1mol/L 柠檬酸-邻苯二胺）：

(1) 柠檬酸（$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$）	2.1g
双蒸水	100ml

(2) 邻苯二胺（OPD）0.12g 溶于 0.1mol/L 柠檬酸 100ml 中，分装，0℃以下避光保存，可保存半年至一年。

工作液：临用前将 A 液和 B 液以 2∶1 比例配成，每 100ml 中加入 30% H_2O_2 40μl。

四、细胞培养相关试剂

(1) 细胞培养常用缓冲液

表 A.4.1　细胞培养常用缓冲液　(单位:g/L)

缓冲液	Earle	Hank's	Ringer	Dulbecco	PBS
NaCl	6.80	8.00	9.00	8.00	8.00
KCl	0.40	0.40	0.42	0.20	0.20
$CaCl_2$	0.20	0.14	0.25	0.10	
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$				0.10	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20	0.20			
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$		0.13		3.18	2.57
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.14				
KH_2PO_4		0.06		0.20	0.20
$NaHCO_3$	2.20	0.35			
葡萄糖	1.00	1.00			
酚红	0.02	0.02		0.02	

配制缓冲液后，10lb 高压灭菌 15min，4℃保存。如出现沉淀、混浊或显著的颜色变化，即应弃去。

(2) 标准组织细胞培养基

表 A.4.2　标准组织细胞培养基　(单位:mg/L)

成分	DMEM	RPMI-1640	Hank's F-12
$CaCl_2$	200	—	33
$Ca(NO_3) \cdot 4H_2O$	—	100	—
$CuSO_4 \cdot 6H_2O$	—	—	0.0023
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	0.1	—	—
$FeSO_4$	—	—	0.46
KCl	400	400	220
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200	100	150
NaCl	6400	6000	7600
$NaHCO_3$	3700	2000	1200
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	141	—	—
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	—	2017	352
$ZnSO_4 \cdot H_2O$	—	—	0.86
葡萄糖	4500	2000	1800
谷胱甘肽	—	1	—
次黄嘌呤	—	—	4.1
硫辛酸	—	—	0.21
甲基亚油酸	—	—	0.088
酚红，钠盐	15	5	1.2

续表

成分	DMEM	RPMI-1640	Hank's F-12
二盐酸丁二胺	—	—	0.16
丙酮酸钠	110	—	110
胸腺嘧啶脱氧核苷	—	—	0.73
L-丙氨酸	—	—	0.89
L-精氨酸	—	200	—
L-精氨酸盐酸盐	84	—	210
L-天冬酰胺，水合	—	57	15
L-天冬氨酸	—	20	13
L-半胱氨酸	48	50	—
L-半胱氨酸盐酸盐，水合	—	—	35
L-谷氨酸	—	20	15
L-谷氨酰胺	580	300	150
甘氨酸	30	10	7.5
L-组氨酸	—	15	—
L-组氨酸盐酸盐，水合	42	—	21
L-羟脯氨酸	—	20	—
L-异亮氨酸	105	50	3.9
L-亮氨酸	105	50	13
L-赖氨酸，水合	150	40	37
L-蛋氨酸	30	15	4.5
L-苯丙氨酸	66	15	5
L-脯氨酸	—	20	35
L-丝氨酸	42	30	11
L-苏氨酸	95	20	12
L-色氨酸	16	5	2
L-酪氨酸	72	20	5.4
L-缬氨酸	94	20	12
生物素	—	0.2	0.0073
D-泛素钙	4	0.25	0.24
氯化胆碱	4	3	14
叶酸	4	1	1.3
i-肌酸	7	35	18
对氨基苯甲酸	—	4	—
盐酸吡哆醛	4	—	—
盐酸吡哆醇	—	1	0.062
核黄素	0.4	0.2	0.038
盐酸硫胺素	4	1	0.34
维生素 B_{12}	—	0.005	1.4
尼克酰胺	4	1	0.037

配制缓冲液后，10lb 高压灭菌 15min，4℃保存。如出现沉淀、混浊或显著的颜色变化，即应弃去。

(3) 胰酶消化液

A 液：1% EDTA（乙二胺四乙酸二钠）

EDTA	1.0g
NaCl	0.8g
KCl	0.02g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.29g
KH_2PO_4	0.02g
双蒸水	100ml

逐项溶解后，10lb 15min 高压灭菌，按 2ml 量分装，置 4℃保存。

B 液：1%胰蛋白酶

胰蛋白酶	1g
Hank's 液	100ml

取 A 液 2ml 与 B 液 10ml 混合，加 pH7.4 0.01mol/L PBS 至 100ml，0.22μm 滤膜过滤，分装，置 4℃保存。

(4) 抗生素（三抗）

青霉素	100 万 U
链霉素	1g
卡那霉素	0.5g
无菌水	100ml

逐项溶解后，过滤，分装小瓶，-20℃低温保存。使用时，每 99ml 培养液中加入 1ml 三抗，使青霉素终含量为 100U/ml，链霉素 100μg/ml，卡那霉素 50μg/ml。可以防止革兰氏菌污染。

(5) 无钙、镁的 Hank's 液

NaCl	8.00g
KCl	0.40g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.13g
KH_2PO_4	0.06g
$NaHCO_3$	0.35g
葡萄糖	1.00g
酚红	0.02g

逐项溶解于 1000ml 双蒸水中，10lb 高压灭菌 15min，4℃保存。

(6) 抗真菌试剂

两性霉素 B：用无菌水或生理盐水配制 1000 倍贮存液，过滤除菌，分装后-20℃保存。应用的终浓度是 3μg/ml。临用前加入培养液。

制霉菌素：用无菌水或生理盐水配制 1000 倍贮存液，过滤除菌，分装后-20℃保存。应用的终浓度是 50U/ml。临用前加入培养液。

(7) 谷氨酰胺

谷氨酰胺：用培养液或生理盐水配制100倍的贮存液，过滤除菌，分装后－20℃保存。应用的终浓度是3mmol/L。临用前加入培养液。

(8) 2-巯基乙醇

2-巯基乙醇：100ml双蒸水中加入0.78ml 2-巯基乙醇，配制成10mmol/L的贮存液，过滤除菌，分装后－20℃保存。应用的终浓度是$1\times10^{-5}\sim5\times10^{-5}$mol/L。临用前加入培养液。

五、常用染色试剂

(1) 瑞氏（Wright）染色液

Wright染色粉	0.1g
甲醇	60ml

Wright染色粉由美蓝与伊红配成，将Wright染色粉置于乳钵内研溶于甲醇中，过滤后保存于紧密的棕色瓶中，保存时间愈久染色效果愈佳。

染色法①：常规方法制成薄涂片后，于空气中自然干燥。滴加瑞氏染液固定涂片1min。再滴加等量或2～3倍的双蒸水或pH6.4磷酸盐缓冲液（PB），混合均匀后染色3～5min。以水冲洗后，待干，镜检。

染色法②：常规方法制成薄涂片后，自然干燥。滴加甲醇固定1～2min，用Wright染色液1份加2份pH6.4的PB，滴于涂片上染色5～15min，以水冲洗后，待干，镜检。

(2) 吉姆萨（Giemsa）染色液

吉姆萨染色粉（天青与伊红）	0.5g
甘油	33ml
甲醇	33ml

将吉姆萨染色粉用乳钵磨成细粉，置棕色瓶内，然后徐徐加入甘油，搅拌混匀，置于60℃水浴内，间歇搅拌，2h后，加甲醇混合而成。临用时以pH7.0磷酸盐缓冲液（PB）稀释10倍。

染色法：将甲醇滴加于标本上固定1～2min，空气中自然干燥，加吉姆萨染色液10～15min，水洗，印干镜检。

(3) 伊红Y染色液

伊红Y染料	0.5g
0.9%生理盐水	100ml

配制成0.5%的伊红Y染色液，放磨口瓶中备用。

(4) 台盼蓝染色液

台盼蓝染料	0.5g
0.01mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液	100ml

台盼蓝染料溶解后于4℃保存，使用前滤纸过滤。

六、固定试剂

(1) 4%多聚甲醛-磷酸缓冲液，pH7.4

多聚甲醛	40g
0.1mol/L 磷酸盐缓冲液，pH7.4	1000ml

称取多聚甲醛 40g，置于三角烧瓶中，加入 600～800ml 0.1mol/L 的磷酸缓冲液(PB)，加热至 60℃，持续搅拌（或磁力搅拌）使粉末完全溶解，通常需滴入少许 1mol/L NaOH 使溶液清亮，最后补足 0.1mol/L PB 至 1000ml，充分混匀，该固定剂适于光镜免疫细胞化学研究，适于标本的长期保存。

(2) 4%多聚甲醛-磷酸二氢钠/氢氧化钠

A 液：	多聚甲醛	40g
	双蒸水	1000ml
B 液：	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	16.88g
	双蒸水	300ml
C 液：	NaOH	3.86g
	双蒸水	200ml

A 液配制方法同前，至多聚甲醛完全溶解后冷却待用。注意避免吸入甲醛气体或溅入眼中。B 液和 C 液配好后，将 B 液倒入 C 液中，混匀后再加入 A 液中。以 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调 pH 至 7.2～7.4，最后，补足双蒸水至 1000ml，4℃保存。该固定剂适于光镜和电镜下免疫细胞研究，用于电镜时，最好加入少量新鲜配制的戊二醛，使其终浓度为 0.5%～1%，比较适于组织、细胞标本长期保存。

(3) 改良的 Bouin 液

饱和水杨酸	85ml
冰乙酸	5ml
38%～40%甲醛	10ml

新鲜配制，先过滤饱和水杨酸，加入甲醛，最后加入冰乙酸，混合后于 4℃保存。该固定液对组织的穿透力较强，固定较好，结构完整，但因为偏酸（pH3～3.5），对组织抗原有损害，且组织收缩明显，故不适于标本的长期保存。

(4) Karnovsky 固定液，pH7.4

多聚甲醛	30g
25%戊二醛	80ml
0.1mol/L PB	补足至 1000ml

先将多聚甲醛溶于 0.1mol/L PB 中，再加入戊二醛，最后加入 0.1mol/L PB 至 1000ml，混匀。该固定剂适于电镜免疫细胞化学，用该固定剂在 4℃短时固定，比在低浓度的戊二醛中长时间固定能更好地保存抗原和细胞微结构。

(5) 0.4%对苯醌

对苯醌	4.0g
0.01mol/L PBS	1000ml

取对苯醌溶于 PBS 中即可，该固定剂对抗原具有较好的保护作用，但对超微结构的保存有一定影响，故常与醛类固定剂混合使用，一般临用前配制，注意对苯醌有剧毒，使用时避免吸入或接触皮肤。

6. PFG 液

对苯醌	20g
多聚甲醛	15g
25%戊二醛	40ml
0.1mol/L 二甲胂酸钠缓冲液	至 1000ml

先以 500ml 的二甲胂酸钠缓冲液溶解对苯醌及多聚甲醛，再加入戊二醛，最后补足二甲胂酸钠缓冲液至 1000ml。该固定适于多种肽类抗原的免疫细胞化学研究。

七、蛋白相关试剂与缓冲液

(1) SDS-PAGE 蛋白电泳浓缩胶缓冲液

4×Tris-Cl/SDS 缓冲液，pH6.8

将 6.05g Tris 溶解在 40ml 水中，用 1mol/L HCl 调 pH 至 6.8，再用水定容至 100ml。用 0.45μm 滤膜过滤，加入 0.4g SDS，4℃保存（Tris-Cl 终浓度为0.5mol/L，SDS 终浓度为 0.4%）。

(2) SDS-PAGE 蛋白电泳分离胶缓冲液

4×Tris-Cl/SDS 缓冲液，pH8.8

将 91g Tris 溶解在 300ml 水中，用 1mol/L HCl 调节 pH 至 8.8，再用水定容至 500ml。用 0.45μm 滤膜过滤，加入 2g SDS，4℃保存（Tris-Cl 终浓度为 1.5mol/L，SDS 终浓度为 0.4%）。

(3) SDS-PAGE 电泳样品缓冲液（5×）

1mol/L Tris-HCl，pH6.8	0.6ml
50%甘油	5ml
10%SDS	2ml
2-巯基乙醇	0.5ml
1%溴酚蓝	1ml
双蒸水	0.9ml

配制后，分装成 0.5ml/支，可在－20℃保存 3 个月。

(4) SDS-PAGE 电泳缓冲液，pH8.8

Tris	3.03g
甘氨酸	14.4g
SDS	1g

用 1mol/L HCl 调 pH 至 8.8，加水定容至 1L，4℃保存。

(5) 考马斯亮蓝染色液

称 100mg 考马斯亮蓝 G250，溶于 200ml 蒸馏水中，慢慢加入 7.5ml 70%的过氯

酸，最后补足水到250ml，搅拌1h，小孔滤纸过滤。

(6) 脱色液

用量筒取250ml 95%乙醇、80ml冰乙酸，用双蒸水定容至1000ml。

(7) SYPRO Ruby 染色的固定液

可选用以下的一种溶液固定（均用水配制）。

10%（体积比）甲醇	1000ml
7%（体积比）乙酸/25%（体积比）乙醇	1000ml
12.5%（质量体积比）三氯乙酸/10%（体积比）乙醇	1000ml
7%（体积比）乙酸/50%（体积比）乙醇	1000ml
3%（体积比）乙酸/40%（体积比）乙醇	1000ml
10%（体积比）乙酸	1000ml

该溶液室温可保存1个月，使用时这些固定液的体积应在胶体积的5～10倍以上。固定时，薄层胶（<0.75mm）较之厚胶可以迅速达到平衡。胶的体积越大，需要更大体积的固定液以交换其中的电泳缓冲液。

(8) 考马斯亮蓝染色和银染的固定液

乙醇	35ml
冰乙酸	10ml
水	55ml

(9) 转移缓冲液

将18.2g Tris和86.5g甘氨酸溶解在4L水中，再加入1200ml甲醇，加水定容至6L。该溶液pH需为8.3～8.4，如使用PVDF滤膜，则要将甲醇浓度降低至15%；使用尼龙膜，可以不用甲醇。

也可采用CAPS转移缓冲液，将2.21g 3-(环己氨基)-1-丙磺酸（CAPS；游离酸），0.5g DTT用水溶解，再加入150ml甲醇，最终用水定容至1L，用NaOH调节该溶液pH至10.5，4℃冷藏。对于分子质量≥60kDa的蛋白质，则要将甲醇浓度降低至1%。

(10) 丽春红染色液

溶解0.05g丽春红S于10ml的双蒸水中。加冰乙酸100μl。临用前新鲜配制。

(11) 30%丙烯酰胺和0.8%双丙烯酰胺

将30.0g丙烯酰胺和0.8g *N′N*-亚甲基双丙烯酰胺加入100ml水中。0.45μm滤膜过滤，4℃暗瓶中保存。30d后，当丙烯酰胺逐渐水解为丙烯酸和氨气时丢弃。使用晶体级丙烯酰胺和双丙烯酰胺。

注意：丙烯酰胺单体具有神经毒性。称量丙烯酰胺时必须戴口罩。配制溶液时必须戴手套，不能用嘴吸取溶液。

八、显色试剂

(1) 3,3-二氨基联苯胺（DAB）显色液

100mmol/L Tris-Cl，pH7.5	5ml

40mg/ml 二氨基联苯铵	100μl
80mg/ml $NiCl_2$	25μl
3% H_2O_2	15μl

临用前新鲜配制，混匀。注意：操作 DAB 需谨慎，戴手套和护具；DAB 是剧毒物质。反应底物可以购买商品化试剂。

(2) 3-氨基-9-乙基卡唑 (AEC) 显色液

在 200μl *N'N*-双甲基甲酰胺中溶解 2.5mg 氨乙基咔唑（AEC）。加 9ml 0.05mol/L 乙酸钠，pH5.0；再加入 4μl 30%（体积比）H_2O_2，0.2μm 滤膜过滤除菌，使用前新鲜配制。

(3) BCIP/NIP 显色液

混匀 33μl NBT 贮存液（100mg NET 溶解于 2ml 的 70% DMF 中，4℃下可保存 1 年）和 5ml 碱性磷酸酶底物缓冲液（参见附录 A.3）。再加入 17μl BCIP 贮存液（100mg BCIP 溶解于 2ml 的 70% DMF 中，4℃下可保存 1 年），混匀。室温下可稳定 1h。

(4) 4CN 显色液

混匀 20ml 冰预冷的甲醇和 60mg 4-氯萘酚（4CN）。另外配制 100ml TBS（100mmol/L Tris-Cl，pH7.4，0.9% NaCl）与 60μl 30%（体积比）H_2O_2 的混合液。使用时迅速混合两种液体。

(5) 氨基苯二酰肼显色液

4mg/ml（溶解于 DMSO 中的氨基苯二酰肼）	0.5ml
1mg/ml（溶解于 DMSO 中的异丙醇）	0.5ml
100mmol/L Tris-Cl，pH 7.5	2.5ml
3% H_2O_2	25μl
H_2O	5ml

临用前配制，可以预先混匀氨基苯二酰肼底物混合剂。选用异丙醇可提高发光强度。氨基苯二酰肼和异丙醇在－20℃下可贮存 6 个月。

九、其他

(1) LB 培养基

蛋白胨	10g
酵母粉	5g
NaCl	5g
双蒸水	至 1000ml

将溶液混匀，以 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.0，高压灭菌 25min，冷却至≤50℃，加入选择性抗生素和其他补充营养成分。该培养基的缓冲能力一般，培养过程中，溶液缓冲能力接近饱和时，溶液 pH 会下降。

(2) 2YT 培养基

蛋白胨	16g

酵母浸出物	10g
NaCl	5g

将溶液混匀，以 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.0，高压灭菌 25min，冷却至≤50℃，加入选择性抗生素和其他补充营养成分。室温下可长期保存。

(3) M9 培养基

5×M9 培养基：

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	85.5g
KH_2PO_4	15g
NaCl	2.5g
NH_4Cl	5g
双蒸水	至 1L

高压灭菌 25min，室温贮存。临用前以无菌水稀释 5 倍。

(4) SOC 培养基

蛋白胨	2g
酵母浸出物	0.5g
NaCl	0.05g
双蒸水	100ml

高压灭菌冷却后，加入 0.1ml 无菌的 1mol/L 氯化镁、0.1ml 无菌的 1mol/L 氯化钾和 0.9ml 40%（质量体积比）葡萄糖，用 0.2μm 的滤器过滤。室温保存。

(5) 饱和硫酸铵

硫酸铵	76g
双蒸水	100ml

加热（低于沸点），持续搅拌，室温放置过夜。硫酸铵在 100℃ 的溶解度为 76g/100ml。

(6) EDTA

溶解 186.1g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 于 700ml 双蒸水中，加入固体 NaOH（约 12g）调节 pH 为 8.0，补足双蒸水至 1000ml。

(7) TE (Tris/EDTA) 缓冲液

10mmol/L Tris-Cl，pH 7.4、7.5、7.6 或 8.0

1mmol/L EDTA，pH 8.0

附录B　免疫学常用实验动物

一、常用小鼠品系

表 B.1.1　常用小鼠品系:H-2单倍型和其他基因座

品系	单倍型	H-2复合体						其他基因座			
		K	Ab	Aa	Eb	Ea	D	Thy-1	CD5	CD8	CD45
常用品系											
AKR/J	k	k	k	k	k	k	k	1	2	1	2
ASW/Sn	s	s	s	s	s	—	s	2	2	2	ND
C57BR	k	k	k	k	k	k	k	2	2	2	2
C57BL/10	b	b	b	b	b	—	b	2	2	2	2
C3H/HeJ	k	k	k	k	k	k	k	2	1	1	2
BALB/c	d	d	d	d	d	d	d	2	2	2	2
C57BL/6	b	b	b	b	b	—	b	2	2	2	2
CBA/J	k	k	k	k	k	k	k	2	1	2	2
DBA/2	d	d	d	d	d	d	d	2	1	1	2
SJL	s	s	s	s	s	—	s	2	2	2	1
P/J	p	p	p	p	p	p	p	ND	ND	ND	ND
同类系											
BALB. B	b	b	b	b	b	—	b	2	2	2	ND
BALB. K	k	k	k	k	k	k	k	2	2	2	ND
B10. BR	k	k	k	k	k	k	k	2	2	2	ND
B10. D2	d	d	d	d	d	d	d	2	2	2	ND
B10. Q	q	q	q	q	q	—	q	2	2	2	ND
B10. S	s	s	s	s	s	—	s	2	2	2	ND
重组系											
A	a	k	k	k	k	k	d	2	2	2	2
A/J	a	k	k	k	k	k	d	2	2	2	2
A. TL	tl	s	k	k	k	k	d	2	2	2	ND
B10. A	a	k	k	k	k	k	d	2	2	2	2
B10. A(1R)	h1	k	k	k	k	k	b	2	2	2	2
B10. A(2R)	h2	k	k	k	k	k	b	2	2	2	2
B10. A(3R)	i3	b	b	b	b/k	k	d	2	2	2	1
B10. A(4R)	h4	k	k	k	k/b	b	b	2	2	2	1
B10. A(5R)	i5	b	b	b	b/k	k	d	2	2	2	2
B10. T(6R)	y2	q	q	q	q	—	d	2	2	2	2
B10. S(7R)	t2	s	s	s	s	—	d	2	2	2	2
B10. S(8R)	as1	k	k	k	k/s	—	s	2	2	2	2
B10. S(9R)	t4	s	s	s	s/k	k	d	2	2	2	2
B10. HTT	t3	s	s	s	s/k	k	d	2	2	2	2

注:ND,未测;"—"代表没有检测到。

本表摘自 Klein 等(1990)。见参考文献。

二、常用大鼠品系

表 B. 2. 2　常用大鼠品系:RT1 单倍型和其他座位

品系	单倍型	RT1 复合体[a]					其他基因座[a,b]				
		A	B	D	E[c]	G	C	RT2	RT3	RT6	RT7
近交系											
ACI	av1	a	a	a	—[e]	ND	ND	b	a	ND	ND
DA	av1	a	a	a	—	c	a	b	a	a	b
BUF	b	b	b	b	—	c	ND	a	a	a	b
PVG	c	c	c	c	u	c	c	b	a	a	ND
BDIX	dv1	d	d	d	—	a	ND	b	b	b	a
SHR	k	k	k	k	—	ND	ND	b	b	a	a
LEW	l	l	l	l	—	a	l	a	a	a	a
F344	lv1	l	l	l	—	c	ND	a	b	b	a
WKY	l[d]	l	l	l	—	ND	ND	a	b	b	a
BN	n	n	n	n	—	c	ND	a	b	b	a
BB	u	u	u	u	u	ND	ND	b	b	a	a
LOU/C	u	u	u	u	ND	ND	ND	b	a	b	b
WAG	u	u	u	u	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
同类系											
BN. 1(LEW)	l	l	l	l	—	a	l	a	b	b	a
LEW. 1A(AVN)	a	a	a	a	ND	ND	ND	a	a	a	a
LEW. 1AV1(DA)	av1	a	a	a	—	c	a	a	a	a	a
LEW. 1F(AS2)	f	f	f	f	—	c	ND	a	a	a	a
LEW. 1N(BN)	n	n	n	n	—	c	ND	a	a	a	a
LEW. 1W(WP)	u	u	u	u	u	ND	ND	a	a	a	a
PVG-$RT1^{av1}$(DA)	av1	a	a	a	ND	ND	ND	b	a	a	ND
无胸腺的同类系											
F344-rnu/+	rnu	l	l	l	—	c	ND	a	b	b	a
LEW-rnu/+	rnu	l	l	l	—	a	l	a	a	a	a
WAG-rnu/+	rnu	u	l	l	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重组系[e]											
R16	r16	a	a	a	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R21	r21	l	l	l	u	c	ND	ND	ND	ND	ND
R33	r33	a	a	a	u	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重组单倍型的同类系											
LEW. 1AR1	r2	a	u	u	ND	ND	u	a	a	a	a
LEW. 1AR2	r3	a	a	a	ND	ND	u	a	a	a	a
LEW. 1WR1	r4	u	u	u	ND	ND	a	a	a	a	a
LEW. 1WR2	r6	u	a	a	ND	ND	a	a	a	a	a
PVG. 1R1	r1	a	c	c	ND	ND	c	b	a	a	ND
PVG. 1R8	r8	a	u	u	u	ND	u	b	a	a	ND
PVG. 1R19	r19	a	a	a	ND	ND	c	b	a	a	ND
PVG. 1R20	r20	c	c	c	ND	ND	a	b	a	a	ND

a. ND,未测;

b. RT2 和 RT3 是血液抗原,RT6 和 RT7 是淋巴细胞分化抗原;

c. RT1. E 是等位基因;

d. 一些 WKY 杂交系有 k 单倍型;

e. “—”代表没有检测到;

本表摘自 Gill 等(1995)。见参考文献。

三、实验动物的管理、注射、采血、脏器摘除及解剖

1. 实验动物的管理

1）实验室中常用的动物有小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、绵羊、鸡等，欲使动物实验准确可靠，应选用健康无病动物。最好购买纯系动物，并自行繁殖同系纯种动物。如购买动物，一般要观察数天，证明无隐性传染病方可使用。

2）实验动物必须按各品系分开饲养，动物培养室内及培养橱要保持清洁，空气畅通，应用防蚊、蝇和恒温设备，并注意防止动物逃跑。

3）实验动物的饲料要保证动物生长所需，饮食一般应足量。有时根据实验需要，对饲料成分进行生化检测，以避免动物摄取了影响实验结果的物质。

4）实验动物要有详细记录，包括品系、性别、体重、体表特征、接种物、接种日期、次数、途径和剂量，以及接种或处理后的变化如体温等。可采用复红（红色）和苦味酸（黄色）等染料涂于身体不同的部位，以助识别。

5）实验动物于接种后，需每天观察 1 或 2 次，注意动物的活动能力，饮食与排便情况，体温升降，以及注射处或手术处有无局部反应或全身症状，如不安、耸毛、软弱、震颤、弓背、抽搐、麻痹以及死亡等，并详细记录。

6）实验动物应严防逃跑，动物排泄物以及使用的笼具等要严格消毒。一般来说，做过某种实验的动物，不宜再应用于其他实验。

2. 实验动物的注射法

（1）小鼠、大鼠、豚鼠的腹腔注射法

1）用左手拇指与食指捏住小鼠颈部皮肤，用右手拉住小鼠尾部，翻转鼠体使其仰面向上，用左手无名指与小指将鼠尾部压于手掌下，将鼠固定。

2）将左或右下腹部消毒，使鼠头略向下倾，针头由下腹部刺入腹腔，注射量一般为 0.2～0.5ml。

（2）小鼠、大鼠、豚鼠的肌内注射法

左手固定小鼠，右手持注射器自大腿外侧，将针头垂直刺入肌肉内，缓缓注入，注射前后均应消毒局部皮肤。

（3）小鼠、大鼠、豚鼠的鼻腔接种法

先用乙醚麻醉，至其呼吸均匀，左手持鼠，用手指固定其头部，应选择动物呼气时自鼻孔滴入，滴入量为 0.03～0.05ml。

（4）小鼠、大鼠、豚鼠的脑内（颅腔）接种法

1）用左手拇指与食指固定小鼠的头部，切勿过度用力，以免死亡。

2）消毒颈部，由眼内角与耳底连线的中部刺入颅腔。注射量为 0.02～0.03ml。注射完毕，再次消毒注射孔。

（5）小鼠、大鼠、豚鼠的皮内注射法

使动物侧卧，剔除腹部或背部的毛，消毒皮肤，针头平刺入皮肤内，将注射剂缓缓

注入。若皮肤呈白色直状隆起，其上毛孔明显可见，即表示注入皮内。注射量0.1～0.2ml，注射完毕，应将针头旋转半周再拔出，可免液体随针孔流出。

(6) 小鼠、大鼠、豚鼠的皮下接种法

消毒皮肤。用左手拇指与食指将注射部位皮肤拉起，直接刺入，注射量不超过1ml。

(7) 小鼠、大鼠、豚鼠的静脉注射法

1）将动物固定，消毒耳外缘部皮肤，用左手固定耳部，右手持注射器将针头刺入血管内，徐徐注入，若注射畅通无阻表示已注入血管。

2）注射完毕，以棉球压迫注射处，至血凝。

3）注意：若需多次静脉注射，应自耳尖的部位开始，逐渐移向耳根部，以免静脉梗塞，吸取注射液时注射器内不得留有气泡，否则形成气栓致动物死亡。

3. 实验动物的采血法

(1) 家兔或豚鼠的心脏采血法

1）将动物仰卧固定，拔除胸部左侧的毛发，消毒。

2）用右手按触心跳最明显的部位，即用7～9号针头自胸壁直接刺入，若确已刺入心脏，可觉出针尖随心跳而搏动，稍抽针筒即有血流出，此时即可进行采血。家兔每次可采血15～20ml，豚鼠2～4ml。如不见血液抽出时，可把针头前后缓缓移动，但切勿搅动，如仍无血抽出，宜将针头拔出重新刺入，并检查针头是否堵塞。

(2) 绵羊颈静脉采血法

1）将绵羊侧卧于地上，用绳缠住四脚或用固定架固定。

2）将一侧颈部的毛剪短或剃去，彻底消毒皮肤。

3）于颈部缠以橡皮带，或由助手压迫颈静脉的近心端使其隆起便于注射。此时即可用已灭菌的粗针头刺入颈静脉内抽取血液。取毕将针头拔出，用棉球按于针刺处以免持续出血。成年羊每隔2～4周可采血200～400ml。

(3) 小鼠和大鼠的眼眶和眼血管丛采血法

1）捕捉动物，麻醉动物。

2）将微量采血管末端置于眼眶中间眼角，缓缓旋转，将采血管尖向眼窝后部插入，直到有血流进管内。

3）取毕，以棉球擦拭渗出的血迹。

(4) 小鼠和大鼠的尾静脉采血法

1）捕捉动物，固定小鼠。

2）消毒尾巴。

3）一手拉伸尾巴，另一手将针头向下插入侧面的尾静脉3～4mm，用微量采血管收集从针头里流出的血。

4）取毕，用棉球压迫止血。

4. 实验动物的脏器摘除

(1) 小鼠脾脏摘除术

1）术前10～15min麻醉动物，观察动物反应。消毒手术区域毛发。

2）将小鼠取右侧卧位于手术板上。用剪刀在左侧后肢与臀部中间部位切开一个约2.5cm长的切口，用止血钳的钝性末端分离皮下组织。

3）在腹膜上切开1～2cm的切口，用镊子和止血钳轻柔分离脾脏，逐渐将脾脏分离、拖出置于腹腔外。

4）以缝线和针结扎脾动脉，如术中发生大量出血，则结扎脾脏的输出静脉。

5）继续分离连接的肠系膜和结缔组织，取出脾脏。

6）缝合腹膜、皮肤，消毒切口。

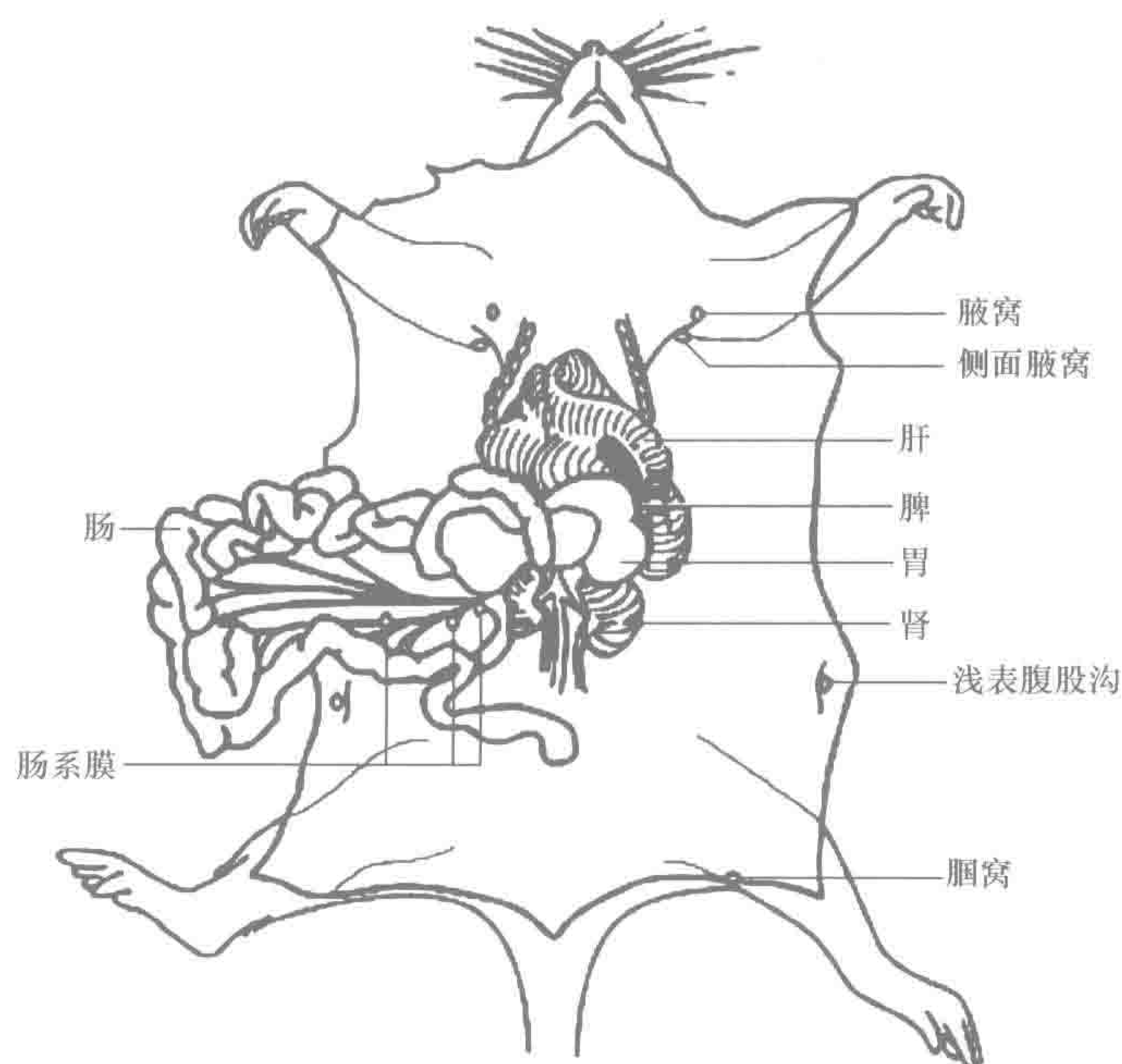
(2) 小鼠淋巴结和胸腺摘除术

1）颈椎脱臼法处死小鼠，将动物仰卧于解剖板上，消毒手术区域。

2）以眼科剪沿体表中线剪开切口。

3）调整动物体位，逐步暴露淋巴结［步骤4）～6)］；摘除胸腺则不需要改变体位［步骤7）～10)］。

4）按图B-1的分布鉴别体内各处淋巴组织。通常腋窝淋巴结位于剪开的区域两侧，邻近的三头肌区域中有时也能找到臂状淋巴结。颈部淋巴结与气管持平，位于唾液腺下方。腹股沟的淋巴结常处于连接皮肤的脂肪垫上。肠系膜淋巴结位于小肠肠系膜深处。通常1只小鼠体内可以分离出1×10^7～5×10^7的淋巴结细胞。



图B-1　小鼠淋巴结分布图

5）用弯钳夹住淋巴结，用止血钳和镊子将其从结缔组织中轻柔分离开。

6）将取出的淋巴结置于盛有数毫升 Hank's 液或组织培养基的培养皿中。

7）用外科剪做胸部切口，从剑状软骨一直延伸到颈部。可用弯钳钝性分开肋骨。

8）分离时，以一把钳插入切口暴露胸腔，另一把钳分离遮盖住胸腺的条状肌。分开肌肉后，一钳夹住胸腺（器官黄白相间，在身体中线上紧挨于肋骨下，接心脏上部）圆锥，另一钳夹住胸腺下缘。然后两钳交替夹持胸腺，以另一钳进行分离，因胸腺实质非常纤细，注意动作必须轻柔。胸腺大小随年龄变化差异很大，在 3～5 周时体积最大，后逐渐萎缩。分离得到的胸腺细胞数量与动物年龄和胸腺大小相关。分离完毕，取出胸腺。

9）清除胸腺上覆盖的结缔组织。

10）将胸腺置于盛有数毫升的 Hank's 液或组织培养基的培养皿中。

5. 感染动物的剖检法

(1) 尸体解剖法

当实验动物发病死亡或人工杀死后，应立即解剖。

1）解剖前一切解剖用具（如剪、刀、镊子）应高压灭菌。

2）将动物放入新洁尔灭溶液内浸泡 5min，取出后放于解剖板上，使其腹部向上，四肢伸展，并用大头针固定。

3）消毒胸部和腹部皮肤。

4）用镊子提起耻骨联合皮肤，用剪刀剪开，并沿中线向上直剪至下颌部，剥离皮下组织，使皮肤向外翻转。

5）注意注射局部、皮下组织、腹股沟及腋下淋巴结，如有腹水可用注射器或尖吸管刺入腹腔内抽取，供培养及涂片检查。

6）自耻骨至横膈膜剪开腹腔，由切口横切，便于向外翻转，并露出腹部各脏器。检查各脏器内有无病变，取材做培养及涂片检查。

7）切断胸骨两侧肋软骨，翻起胸骨，取出心脏与肺脏进行观察，取材做培养及涂片检查。

8）解剖毕，将动物放消毒桶内浸润 24h 后焚化，解剖板用新洁尔灭溶液消毒，解剖器械高压灭菌。

(2) 脑解剖法

用手术剪刀剪破动物颈动脉，放血致死，以新洁尔灭溶液浸润后，固定于解剖板上，消毒头部，用无菌剪刀剪开头皮，暴露头骨，在顶骨与枕骨缝处剪开，在顶骨与枕骨边缘，掀开颅骨，用镊子从颅底取出脑组织，取材做培养及涂片检查。如不及时应用，−20℃以下保存，或将脑组织放于 50% 甘油盐水中，4℃保存。

四、淋巴细胞分离技术

1. 分离外周血中的单个核细胞（PBMC）

淋巴细胞的常用来源是外周血，分离的原则是收率较高，纯度较好，失活较低。根

据不同实验目的可采用密度梯度离心法、吸附分离法或其他特殊分离法。本附录介绍的是密度梯度离心法。其原理是：外周血中各种细胞的密度不同，人红细胞相对密度为1.093，粒细胞为1.092，淋巴细胞为1.074±0.001。密度梯度离心法的原理主要根据各类血细胞比重的差异，利用比重介于某两类细胞之间的细胞分离液对血液离心，使一定比重的血细胞依相应的密度梯度分布于不同的独立区带，从而达到分离的目的。

(1) 试剂与器材

1) 肝素抗凝管，试管，采血针，血清收集管。
2) 淋巴细胞分离液（Ficoll-Hypaque，相对密度为1.077±0.001）。
3) 无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 Hank's 液。
4) 刻度吸管、毛细吸管、离心管、离心机等。
5) 置于冰箱的冷丙酮（固定细胞，保持细胞的完整性）。

(2) 方法

1) 采静脉血 2ml 加入肝素抗凝管（终浓度 10U/ml），用 Hank's 液稀释 1～2 倍。
2) 取等量的淋巴细胞分离液加入试管中。
3) 用毛细滴管取稀释血液，在距分离液面上 1cm 处，沿管壁缓缓加入，使稀释血液重叠于分离液上（尽量避免冲入分离液中），稀释血液与分离液体积比为2∶1。
4) 以 2000g 室温离心 20min，此时离心管中形成 5 层，自上而下依次是血浆、PBMC 层、淋巴细胞分离液层、粒细胞层和红细胞层，用毛细吸管轻轻插入血浆与分离液的界面层，沿试管壁周缘，吸取灰白色层（含淋巴细胞层），移入另一试管中。
5) 加入 5 倍体积的 Hank's 液混匀，1500g 室温离心 10min，弃去上清，将沉淀细胞振摇重悬，再加入 Hank's 液，同法再洗涤 2 次。
6) 最后加 1ml Hank's 液，即制成淋巴细胞悬液。也可按实验要求制备不同浓度的细胞悬液。

(3) 注意事项

1) 将抗凝血与 Hank's 液的混合液加入淋巴细胞分离液时，必须保持两种液体界面清晰。
2) 用毛细吸管吸取淋巴细胞层时，要掌握好力度，在细胞层上做各个方向的吸取，勿吸到其他层的液体或细胞，吸取时勿使各层细胞相混。
3) Hank's 液为等渗缓冲液，类似营养液，保持细胞活性及完整性，可抵抗轻微的酸碱变化。

2. 分离关节液中的单个核细胞

1) 将关节液置于含肝素（终浓度 5U/ml）的离心管中，1000g 室温离心 15min。
2) 以含 2%灭活 BSA 的 Hank's 液悬浮细胞，并洗涤 1 次，每次以 1000g 室温离心 15min。继续以含 2%灭活 BSA 的 Hank's 液悬浮细胞至原体积。
3) 同 A.10.1 的方法分离关节液中的单个核细胞，最后以含 10% BSA 的完全细胞培养基将细胞配制成合适浓度的细胞悬液。

3. 分离组织中的单个核细胞

1）以含 1%庆大霉素和 1% BSA 的 MEM 培养基洗涤手术分离的各种组织。

2）将洗涤过的组织置于培养皿中，加入 5～10 倍体积的 MEM，用无菌的外科剪将组织剪成约 0.5mm³ 大小的碎块。

3）弃去培养液，将组织碎块移入培养瓶中，加入 2～3 倍体积的消化酶溶液（含 5mg/ml 胶原酶、0.15mg/ml DNA 酶的无菌 MEM 培养基），37℃水浴，消化 1～2h。

4）组织碎块分散后，用吸管尽力反复吹打，进一步分散细胞团，再加入 30ml MEM，终止酶反应。

5）将消化悬液滤过 200 目的金属钢网，分离单细胞，继续以 MEM 洗涤细胞 3 次，每次 1000r/min 离心 10min。用 1%台盼蓝染色检测细胞活力并计数（参见第八章补体）。

6）应用本附录中淋巴细胞分离技术的方法分离单个核细胞，并用含 10% BSA 的完全细胞培养基将细胞配制成合适浓度的细胞悬液。

参考文献

柳忠辉，吴雄文，丁天兵，等．2008．医学免疫学实验技术．北京：人民卫生出版社．239～243.

孙卫民，王惠琴．1999．细胞因子研究方法学．北京：人民卫生出版社．789～794.

吴冠芸，潘花珍，吴犛，等．1999．生物化学与分子生物学实验常用数据手册．北京：科学出版社．1～4.

薛庆善，肖渝平，林娟，等．2001．体外培养的原理与技术．北京：科学出版社．64～68.

Gill T，Natori T，Salgar S，et al．1995．Current status of the the major histocompatibility complexes of the rat．Transplant Proc，27（9）：1495～1500.

Klein J，Bontrop R，Dawkins R，et al．1990．Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species：A proposal．Immunogenetics，31（2）：217～219.

Tuffery A．1987a．Laboatory Animals：An Introduction for New Experiments．John Wiley&Sons，Chichester，England．225～226.

Tuffery A．1987b．Labortory Anlmals：An Introduction for New Experiments，p．248．John Wiley&Sons，Chichester，England.

Van Alten P．1984．Thymectomy and engraftment of the thymic tissure．Methods Enzymol，108：10～19.

附录C　常用术语（中英文对照）

英文缩写	英文名称	中文名称
ABC	avidin-biotin complex	生物素-抗生物素蛋白复合物
Ab	antibody	抗体
ACh	acetylcholine	乙酰胆碱
ACIF	anti-complement immunofluorescent	抗补体免疫荧光法
ADA	adenosine deaminase	腺苷脱氨酶
ADCC	antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity	抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用
AFC	antibody-forming cell	抗体形成细胞
AFP	alpha-fetoprotein	甲胎蛋白
Ag	antigen	抗原
AHA	anti-histone antibody	抗组蛋白抗体
AID	anti-immune disease	自身免疫病
AIDS	acquired immunodeficiency syndrom	获得性免疫缺陷综合征
AKP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
AM	adhesion molecule	黏附分子
AMLR	autologous mixed lymphocyte reaction	自身混合淋巴细胞反应
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
ANA	antinuclear antibody	抗核抗体
AO	acridine orange	吖啶橙
Ap	apoptosis body	凋亡小体
APC	antigen presenting cell	抗原提呈细胞
APP	acute phasic protein	急性反应期蛋白
ASO	antistreptolysin O	抗链球菌溶血素 O
ATP	adenosine 5′-triphosphate	三磷酸腺苷
BAS	biotin-avidin system	生物素-亲和素系统
BBS	borate buffer solution	硼酸盐缓冲液
BCG	Bacille Calmette-Guerin	卡介苗
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸对甲苯胺盐
BCR	B cell receptor	B 细胞受体
B-J	Bence-Jones protein	本周氏蛋白
BMD	bone marrow-derived cell	骨髓衍生细胞
bp	base pair	碱基对
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BrUdR	5-bromodeoxyuridine	5-溴脱氧尿嘧啶核苷
C	complement	补体
C	cytosine	胞苷
cAMP	cyclic AMP(adenosine 3′,5′-monophosphate)	环腺苷单磷酸

CD	cluster of differentiation	分化簇
CDC	complement dependent cytotoxicity	补体依赖的细胞毒作用
CDIA	chemiluminescence dot immunobinding assay	化学发光免疫斑点测定
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	互补 DNA
CDR	complementary determinant region	互补决定簇
CEA	carcinoembryonic antigen	癌胚抗原
CFA	complete Freund's adjuvant	完全弗氏佐剂
CFU	colony forming unit	集落形成单位
CH50	50% hemolysis unit of complement	50%补体溶血单位
CIC	circulating immunocomplex	循环免疫复合物
CIEP	counter immunoelectrophoresis	对流免疫电泳
CIg	cytoplasmic immunoglobulin	胞质免疫球蛋白
CIP	calf intestine phosphatase	小牛肠磷酸酶
CK	cytokine	细胞因子
CKR	cytokine receptor	细胞因子受体
CLIA	chemoluminescence immunoassay	化学发光免疫测定
CMV	cytomegalovirus	巨细胞病毒
CNS	central nervous system	中枢神经系统
Con A	concanavalin A	刀豆蛋白 A
CPEI	cytopathic effect inhibition	细胞病变抑制作用
cpm	counts per minute	每分钟计数
CR	complement receptor	补体受体
CRP	C-reactive protein	C 反应蛋白
CSF	colony stimulating factor	集落刺激因子
CTL	cytotoxic T lymphocyte	细胞毒性 T 细胞
CV	coefficient of variation	变异系数
D	Dalton	道尔顿
DAB	diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DAG	diacylglycerol	二酰甘油
dATP	deoxyadenosine triphosphate	三磷酸脱氧腺苷
DC	dendritic cell	树突状细胞
DEAE	diethylaminoethyl-dextran	二氨基乙基葡聚糖
DEPC	diethylpyrocarbonate	二乙基焦碳酸盐
DI	DNA index	DNA 指数
DIBA	dot immunobinding assay	斑点免疫结合试验
DICA	dot immunochromstographic assay	斑点免疫层析试验
DIEFA	dot immunoenzymatic filtration assay	斑点酶免疫渗透试验
DIF	direct immunofluorescent test	直接免疫荧光技术
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium	DMEM 细胞培养基
DMF	dimethylformamide	二甲基甲酰胺
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜

DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DNase	deoxyribonuclease	DNA 酶
Dot-ELISA	dot enzyme linked immunosorbent assay	斑点酶联免疫吸附试验
DTH	delayed type hypersensitivity	迟发型超敏反应
EAE	experimental autoimmune	实验性过敏反应性脑脊髓炎
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
EBV	Epstein-Barr virus	EB 病毒
ECS	electronic cell sorting	电细胞分选
ED50	median effective dose	半数有效剂量
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
EIA	enzyme immunoassay	酶免疫测定
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
ELISAPOT	enzyme-linked immunospot assay	酶联免疫斑点试验
EMEM	Eagle minimal essential medium	Eagle 基础培养基
EPO	erythropoietin	促红素
ES	embryonic stem cell	胚胎干细胞
ESR	erythrocyte sedimentation rate	红细胞沉降率
E/T ratio	effector to target cell ratio	效应细胞/靶细胞比率
Fab	antigen binding fragment	抗原结合片段
FADD	Fas associated death domain protein	Fas 相关死亡蛋白
FACS	Fluorescent activated cell sartor	荧光活化细胞分类仪
Fc	crystallizable fragment	可结晶片段
FCM	flow cytometer	流式细胞仪
FcR	Fc receptor	Fc 受体
FCS	fetal calf serum	胎牛血清
FGF	fibroblast growth factor	成纤维细胞生长因子
F-H	Ficoll-Hypaque	聚蔗糖-泛影葡胺
FIA	fluorescent immunoassay	荧光免疫测定
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
FN	fibronectin	纤维连接蛋白
F/P	fluorochrome to protein ratio	荧光色素-蛋白比率
FSH	follicle stimulating hormone	促卵泡素
g	gravity	重力单位
G	guanine	鸟苷
GCP	granulocyte chemotactic protein	粒细胞趋化蛋白
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor	粒细胞集落刺激因子
GM-CSF	granulocyte-macrophageulating factor	粒细胞巨噬细胞集落刺激因子
GMP	guanosine monophosphate	单磷酸鸟苷
GRO	growth-related oncogene protein	生长相关癌基因编码的蛋白质
GST	glutathione S transferase	谷胱甘肽转移酶

GTP	guanosine 5′-triphosphate	5′-三磷酸鸟苷
GVHD	graft versus host disease	移植物抗宿主病
GVHR	graft versus host reaction	移植物抗宿主反应
H	hypoxanthine	次黄嘌呤
H-2	major histocompatibility complex of mice	小鼠主要组织相容性复合物
HAPRT	hypoxanthine-adenine phosphoribosyl transferase	次黄嘌呤-腺嘌呤磷酸核糖转移酶
HAT	hypoxanthine/aminopterin/thymidine	次黄嘌呤/氨基喋呤/胸腺嘧啶
HAV	hepatitis A virus	甲型肝炎病毒
HBV	hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HBs	hepatitis B surface antigen	乙肝表面抗原
HBSS	Hanks balanced salt solution	Hank's 平衡盐溶液
HEI	homogeneous enzyme immunoassay	均相酶免疫测定
HEPES	*N*-hydroxyethylpiperazine-*N*-ethanesulfonic acid	*N*-2 羟乙基哌嗪-*N*-2 乙磺酸
HGPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase	次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶
HIV	human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
HLA	human leukocyte antigen	人类白细胞抗原
HPLC	high performance liquid chromatography	高效液相层析
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IC	immune complex	免疫复合物
ICAM	intercellular adhesion molecular	细胞黏附分子
IEF	isoelectric focusing	等电聚焦
IEH	immunoenzymatic histochemistry	免疫酶组织化学技术
IEM	immuno electron microscopy	免疫电镜术
IEP	immunoelectrophoresis	免疫电泳
IEX	ion exchange	离子交换
IFA	incomplete Freund's adjuvant	不完全弗氏佐剂
IFA	immunofluorescence assay	免疫荧光分析
IFN	interferon	干扰素
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
IHC	immunohistochemistry	免疫组织化学
IGF	insulin-like growth factor	胰岛素样生长因子
IL	interleukin	白细胞介素
IP3	inositol triphosphate	三磷酸肌醇
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃苷
IRA	immunoradioassay	放射免疫分析
ISH	*in situ* hybridization	原位杂交
IU	international unit	国际单位
JAK	Janus kinase	Janus 激酶
JNK	Jun N-terminal kinase	*c-jun* 基因产物 N 端激酶
kb	kilobase	千碱基对
Kd	balance dissociation constant	平衡解离常数

kDa	kilodaltons	千道尔顿
KLH	keyhole limpet hemocyanin	钥孔血蓝素
LBT	lupus band test	狼疮带试验
LD_{50}	50% lethal dose	半数致死量
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LDL	low density lipoprotein	低密度脂蛋白
LGL	large granular lymphocyte	大颗粒淋巴细胞
LIA	luminescence immunoassay	发光免疫分析
LIF	leucocyte inhibitory factor	白细胞抑制因子
LMIF	leucocyte migration inhibitory factor	白细胞移动因子
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
LSCM	laser scanning confocal microscope	激光扫描共聚焦显微镜
LT	lymphotoxin	淋巴毒素
LTB	leukotriene	白三烯
LTR	long terminal repeat	长末端重复序列
Mφ	macrophage	巨噬细胞
McAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
M-CSF	macrophage colony stimulating factor	巨噬细胞集落刺激因子
MCP	monocyte chemoattractant protein	单核细胞趋化蛋白
MEM	minimum essential medium	基础培养基
MFR	mannosyl fucosyl receptor	甘露岩藻糖受体
MHC	major histocompatibility complex	主要组织相容性复合物
Mix-CFC	mixed CFC	混合集落形成细胞
MIP	macrophage inflammatory protein	巨噬细胞炎性蛋白
MLR	mixed lymphocyte reaction	混合淋巴细胞反应
MW	molecular weight	分子质量
NBB	naphthol blue black	萘酚蓝黑
NBT	nitroblue tetrazolium	硝基四氮唑蓝
NGF	nerve growth factor	神经生长因子
NFAT	nuclear factor of activated T lymphocyte	活化 T 细胞的核因子
NF-κB	nuclear factor κB	核因子 κB
NIH	National Institute of Health	美国国立卫生研究院
NK	natural killer cell	自然杀伤细胞
NOD	Nod-obese diabetics	非肥胖性糖尿病
NP-40	Nonidet P-40	NP-40 去垢剂
OD	optical density	光密度
oligo	oligonucleotide	寡核苷酸
OPD	*O*-phenylene diamine	邻苯二胺
ORF	open reading frame	可读框
OT	old tuberculin	结核菌素
OVA	ovalbumin	卵白蛋白

PAF	platelet-activating factor	血小板活化因子
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶技术
PB	phosphate buffer	磷酸盐缓冲液
PBL	peripheral blood lymphocyte	外周血淋巴细胞
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	外周血单个核细胞
PcAb	polyclonal antibody	多克隆抗体
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PCR-RFLP	restriction fragment length PCR	限制片段长度多态性 PCR
PE	phycoerythrin	藻红蛋白
PEG	polyethyleneglycol	聚乙二醇
PFC	plague forming cell	空泡形成细胞
pfu	plaque formation unit	空泡形成单位
PHA	phytohemagglutinin	植物血凝素
pI	isoelectric point	等电点
PI	proliferous index	增殖指数
PI3K	phosphatidylinostiol 3′-kinase	三磷酸肌醇激酶
PIP2	phosphatidylinostiol biphosphate	磷酸肌醇二磷酸盐
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PLC	phospholipase C	磷脂酶 C
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟化物
PMN	polymorphonuclear neutrophils	多形核中性粒细胞
PPD	purified protein derivative of tuberculin	纯化的结核菌素蛋白衍生物
PV	poliovirus	脊髓灰质炎病毒
PVDF	polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
PWM	pokeweed mitogen	美洲商陆抗原
RA	rheumatoid arthritis	类风湿性关节炎
RF	rheumatoid factor	类风湿性因子
RFLP	restriction fragment length	限制性片段长度多态性
RIA	radioimmunoassay	放射免疫测定
RIEP	rocket immunoelectrophoresis	火箭免疫电泳
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RNase	ribonuclease	RNA 酶
RP-HPLC	reversed-phased HPLC	反向高效液相层析
r/min	rolls per minute	每分钟转速
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium	RPMI-1640 培养基
RT-PCR	reverse transcription PCR	逆转录 PCR
SCF	stem cell factor	干细胞因子
ScFv	single chain fragment variable	单链片段可变区
SCID	severe combined immunodeficiency	重症联合免疫缺陷症
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SDF	stromal cell-derived factor	基质细胞来源的细胞因子

SLE	systemic lupus erythematosus	系统性红斑狼疮
smIg	surface membrane immunoglobulin	膜表面免疫球蛋白
SPA	staphylococcus protein A	葡萄球菌蛋白 A
SRBC	sheep red blood cell	绵羊红细胞
T	thymine	胸腺嘧啶
TCR	T cell receptor	T 细胞受体
TGF	transforming growth factor	转化生长因子
TFA	trifluoroacetic acid	三氟乙酸
Th	T helper cell	辅助性 T 细胞
TIL	tumor infiltrating lymphocyte	肿瘤浸润性淋巴细胞
TLC	thin-layer chromatography	薄层层析
T_m	thermal denaturation	变性温度
TMB	tetramethyl benzidine	四甲基联苯胺
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TPO	thrombopoietin	促血小板生成素
TRAF	TNF receptor associating factor	TNF 受体相关因子
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
Ts	T suppressor cell	抑制性 T 细胞
UTP	uridine 5′triphosphate	三磷酸尿苷
UV	ultraviolet	紫外线
VEGF	vascular endothelial cell growth factor	血管内皮性细胞生长因子
VSV	vesicular stomatitis virus	滤泡口炎病毒
WGA	wheat germ agglutinin	麦胚凝集素
X-gal	xanthine-guanine phosphoribosyl transferase	黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶
ZE	zone electrophoresis	区带电泳
7-AAD	7-aminoactinomycin	7-氨基放线菌素 D
α_2M	α_2-macroglobulin	α_2 巨球蛋白
β2m	β2-microglobulin	β2 微球蛋白
β-gal	β-D-galactosidase	β 半乳糖苷酶

（张　意）

［Ｇｅｎｅｒａｌ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ］
书名＝免疫学技术及其应用
作者＝曹雪涛
页数＝８５８
ＳＳ号＝１４０７６１３２
ＤＸ号＝
出版日期＝２０１６．０９
出版社＝北京科学出版社